

REC'D 15 AUG 2003

WIPO PCT

PCT/JP 03/08248

27.06.03 #2

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 6月28日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-191527  
[ST. 10/C]: [JP 2002-191527]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社カルディオ  
独立行政法人産業技術総合研究所

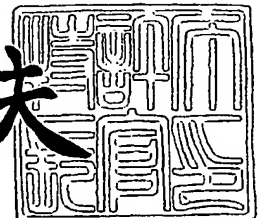
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年 7月31日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J102040139

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61F 2/24

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科E1内

【氏名】 澤 芳樹

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-4 1-911 株式会社カルディオ内

【氏名】 竹谷 哲

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科E1内

【氏名】 盤井 成光

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科E1内

【氏名】 松田 暉

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3-11-46 独立行政法人産業技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究センター

【氏名】 原 正之

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 兵庫県尼崎市若王寺 3-11-46 独立行政法人産業  
技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究セン  
ター

**【氏名】** 内村 英一郎

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 兵庫県尼崎市若王寺 3-11-46 独立行政法人産業  
技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究セン  
ター

**【氏名】** 三宅 淳

**【特許出願人】**

**【識別番号】** 502100138

**【氏名又は名称】** 株式会社カルディオ

**【特許出願人】**

**【識別番号】** 301021533

**【氏名又は名称】** 独立行政法人産業技術総合研究所

**【代理人】**

**【識別番号】** 100078282

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 山本 秀策

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100062409

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 安村 高明

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100113413

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 森下 夏樹

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001878

【納付金額】 10,500円

【その他】 国以外のすべての者の持分割合 5 / 1 0

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 脱細胞化組織

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脱細胞化組織であって、

1) 該組織の細胞残存率は、生体内において免疫反応を惹起するレベル未満であり、かつ

2) 該組織は、該組織が未処理状態で有する機能を発揮するのに支障があるような損傷を受けていない、

脱細胞化組織。

【請求項 2】 前記組織の細胞残存率は、30%以下である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 3】 前記組織の組織損傷率は、30%以下である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 4】 前記組織は、臨床適用することができる組織強度を有する、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 5】 前記組織は、該組織が未処理状態の組織強度の 80%以上の細胞強度を有する、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 6】 前記組織は、該組織が未処理状態の  $\beta$  値の 80%以上の細胞強度を有する、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 7】 20 以上の  $\beta$  値の細胞強度を有する、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 8】 前記組織は、管状組織である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 9】 前記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択されるものの組織である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 10】 前記組織は、哺乳動物由来である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 11】 前記組織は、ヒト由来である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 12】 前記組織は、ブタ由来である、請求項 1 に記載の脱細胞化組織。

【請求項 13】 組織グラフトであって、

1) 請求項 1 に記載の脱細胞化組織であって、該脱細胞化組織には、レシピエント由来の細胞が播種され、培養されて、所望の組織の構造が形成されている、脱細胞化組織、  
を含む、組織グラフト。

【請求項 14】 前記脱細胞化組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択される器官の組織である、請求項 13 に記載の組織グラフト。

【請求項 15】 前記組織は、哺乳動物由来である、請求項 13 に記載の組織グラフト。

【請求項 16】 前記組織は、ヒト由来である、請求項 13 に記載の組織グラフト。

【請求項 17】 前記細胞は、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、血球ならびにこれらに分化する前駆細胞および体性幹細胞からなる群より選択される、請求項 13 に記載の組織グラフト。

【請求項 18】 膜状組織グラフトであって、

1) 請求項 3 に記載の脱細胞化組織であって、該脱細胞化組織には、レシピエント由来の細胞が播種され、培養されて、所望の組織の構造が形成されている、脱細胞化組織、  
を含む、膜状組織グラフト。

【請求項 19】 脱細胞化組織を生産する方法であって、

1) 組織を提供する工程；および  
2) 該組織を、ミセル化しない両親媒性分子を含む溶液に浸す工程、  
を包含する、方法。

【請求項 20】 さらに、

3) 前記組織を洗浄する工程、  
を包含する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 2 1】 前記洗浄は、P B Sで行われる、請求項 2 0に記載の方法

。

【請求項 2 2】 前記ミセル化しない両親媒性分子は、1, 2-エポキシドポリマーである、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 3】 前記ミセル化しない両親媒性分子は、ポリエチレングリコール (P E G) である、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 4】 前記 P E G の平均分子量は、2 0 0 と 6 0 0 0 との間である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】 前記 P E G の平均分子量は、1 0 0 0 と 2 0 0 0 との間である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】 前記 P E G の平均分子量は、1 5 0 0 と 2 0 0 0 との間である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】 前記 P E G の平均分子量は、1 0 0 0 以下である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】 前記浸す工程は、3 0 分間～6 0 分間行われる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 9】 前記浸す工程は、物理的な処理をさらに包含する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 0】 前記洗浄する工程は、3 日間～5 日間行われる、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 1】 前記ミセル化しない両親媒性分子は、生体適合性である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】 前記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】 前記組織は、哺乳動物由来である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】 前記組織は、ヒト由来である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】 さらに、

4) 化学的处理を行う工程、  
を包含する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 36】 前記化学的处理は、DNase による処理である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】 前記化学的处理は、DNase I による処理である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】 請求項 19 に記載の方法によって得られる、脱細胞化組織。

【請求項 39】 組織の再生方法であって、  
1) 請求項 1 に記載の脱細胞化組織を提供する工程；  
2) 該脱細胞化組織に細胞を提供する工程；  
3) 該細胞の分化を誘導する生理活性物質を提供する工程；および  
4) 該細胞の分化が生じるに十分な時間インキュベートする工程、  
を包含する、方法。

【請求項 40】 前記細胞は、血管細胞または血管様細胞である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】 前記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】 前記組織と前記細胞とは、同じ宿主由来である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】 前記組織と前記細胞とは、同種異系宿主由来である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 44】 前記組織と前記細胞とは、異種宿主由来である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 45】 前記細胞は、レシピエント由来である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 46】 組織グラフトを生産する方法であって、  
1) 請求項 1 または 38 に記載の脱細胞化組織を生体内に提供する工程；

2) 該脱細胞化組織に該生体の自己細胞を侵入させる工程; および  
3) 該細胞の分化が生じるに十分な時間インキュベートする工程、  
を包含する、方法。

【請求項 47】 前記細胞は、血管細胞または血管様細胞である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】 前記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】 前記組織は、自己由来である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 50】 前記組織と前記細胞とは、同種異系宿主由来である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 51】 前記組織と前記細胞とは、異種宿主由来である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 52】 さらに、

4) 前記細胞の分化を誘導する生理活性物質を提供する工程、  
を包含する、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 53】 前記生理活性物質は、造血活性を有するサイトカインである、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】 請求項 46 に記載の方法によって生産された、組織グラフト。

【請求項 55】 組織または臓器移植を必要とするかまたは該危険にある被験体の処置または予防の方法であって、

1) 請求項 1 もしくは 38 に記載の脱細胞化組織または請求項 8 に記載の組織グラフトを提供する工程; および

2) 該脱細胞化組織または組織グラフトを被験体に移植する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 56】 前記組織は、前記被験体由来である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】 前記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角

膜および骨から選択されるものの組織である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 58】 前記被験体は、哺乳動物である、請求項 55 に記載の方法

。

【請求項 59】 前記被験体は、ヒトである、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 60】 臓器移植のための医薬であって、

1) 請求項 1 もしくは 38 に記載の脱細胞化組織または請求項 8 に記載の組織グラフト、

を含む、医薬。

【請求項 61】 前記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択されるものの組織である、請求項 60 に記載の医薬。

【請求項 62】 前記細胞は、哺乳動物由来である、請求項 60 に記載の医薬。

【請求項 63】 前記組織は、ヒト由来である、請求項 60 に記載の医薬。

【請求項 64】 前記組織は、前記移植を必要とする被験体由来である、請求項 60 に記載の医薬。

【請求項 65】 前記組織は、ブタ由来である、請求項 60 に記載の医薬。

【請求項 66】 臓器移植のための医薬を製造するための、請求項 1 もしくは 38 に記載の脱細胞化組織または請求項 13 に記載の組織グラフトの、使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、組織を脱細胞化するための方法およびシステム、ならびにそのような脱細胞化方法によって調製された組織、組織グラフトなどを利用した医薬および治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

臓器（例えば、心臓、血管など）の移植に外来性組織を使用する際の主な障害は免疫拒絶反応である。同種異系移植片（または同種移植片、*allograft*）と異種移植片（*xenograft*）で起こる変化が最初に記述されたのは

90年以上前のことである (Carrel A., 1907, J Exp Med 9:226-8; Carrel A., 1912., J Exp Med 9:389-92; Guthrie CC., 1908, J Am Med Assoc; Calne RY., 1970, Transplant Proc 2:550; および Auchincloss 1988, Transplantation 46:1)。動脈移植片の拒絶反応は、病理学的には移植片の拡張 (破裂に至る) または閉塞のいずれかを招く。前者の場合、細胞外マトリクスの分解により生じ、一方、後者は血管内細胞の増殖により起こる (Uretsky BF, Mulari S, Reddy S, et al., 1987, Circulation 76:827-34)。

### 【0003】

従来、これらの物質の拒絶反応の軽減を目指して2つの戦略が採用されてきた。ひとつは、宿主の免疫反応を低下させた (Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin RB, Williams AM, Abbot W., 1988, J Vasc Surg 7:82-92; および Plissonnier D, et al., 1993, Arteriosclerosis Thromb 13:112-9)。もうひとつは主に架橋結合により同種移植片または異種移植片の抗原性の低下を図った (Rosenberg N, et al., 1956, Surg Forum 6:242-6; および Dumont C, Plissonnier D, Michel JB., 1993, J Surg Res 54:61-69)。細胞外マトリクスの架橋結合は移植片の抗原性を低下させるが、生体工学的機能 (Cosgrove DM, Lytle BW, Golding CC, et al., 1983, J Thorac Cardiovasc Surgery 64:172-176; および Broom N, Christie GW., 1982, In: Cohn LH, Gallucci V, editors. Cardiac bioprostheses: Proceedings of the Second International Symposium. New York: York Medical Books Pages 476-491) が変化し、無機質

化に感受性を示すようになる (Schoen FJ, Levy RJ, Piehler HR., 1992, Cardiovasc Pathology 1992;1:29-52)。

#### 【0004】

細胞外マトリクス中の細胞は、拒絶反応を引き起こし得る組織適合性クラスIおよびII抗原を有する。また、その他に宿主の免疫系が特定できる細胞由来の糖化タンパク質があり、拒絶反応が引き起こされる。故に、このような物質を細胞外マトリクスから除去すれば、拒絶反応を防ぐことができる。ただ、全ての抗原を完全に除去するのは非常に困難であり実証が難しい。Maloneら (Malone JM, Brendel K, Duhamel RC, Reinert RL., 1984, J Vasc Surg 1:181-91) およびLalkaら (Lalka SG, Oelker LM, and Malone JM, et al., 1989, Ann Vasc Surg 3:108-17) は、「細胞のない」動脈同種移植片 (同種動物への移植片) を移植したマトリクスも免疫応答反応を刺激したが、一方で血管内増殖と内皮細胞の生着も認められたと報告した。つい最近では、O' Brianらが、脱細胞化したブタ組織は心血管移植に応用が可能であり、ヒツジに植込んだ際には超急性拒絶反応を示さなかったと報告した (O' Brien MF, et al., 1999 (October), Seminars in Thorac and Cardiovasc Surg;111 (4), Suppl 1:194-200)。

#### 【0005】

心血管疾患 (冠状動脈および末梢血管の疾患を含む) は、手術による置換療法 (により処置されている。心血管疾患の症例は、世界中でこのところ増加している。直径が小さな血管の場合は、置換療法を適用することは困難である。直径が小さい場合、バイパス手術では、自己由来の静脈または動脈の移植片が使用される (Canver CC., 1995, Chest 1995;108 1150-1155; Barner HB., 1998, Ann Thorac Surg 66 (Suppl 5) S2-5; discussion S25-28; およびBhan A, Gupta V, Choudhary SK, et al



., 1999, Ann Thorac Surg 1999; 67 1631-1636)。静脈および動脈の移植片が現状ではもっともよい結果が得られているが、複雑な手術を必要とし、ある疾患の患者では適切な血管が得られないといった欠点も存在する。その結果、直径が細い血管に適切な人工血管が必要とされている。自己移植片または同種異系移植片の使用を減少させるために、人工材料の開発に向けた開発がなされた。しかし、人工材料の場合、四肢末梢および冠状動脈のバイパス移植手術に必要な細い直径の動脈（6 mm未満）の構築に適切なものはない。他方、心臓血管の場合、天然の組織移植片もまた臨床応用における生体材料としての可能性が試されている。異種移植片および同種異系移植片の組織の使用は、代表的には、化学的または物理的な処理が必要である（例えば、グルタルアルデヒド固定）。架橋技術は、組織のコラーゲンベースの構造を安定化するのに手順も調べられ、理想的な手順であることが見出された（Hilbert SL, Ferrans VJ, Jones M., 1988, Med Prog Technol 89; 14, 115-163）。

#### 【0006】

しかし、移植には、長期的な視点から石灰化という問題がある。グルタルアルデヒド処理の際の石灰化という有害な副作用は、生体人工心臓弁の欠陥の主な原因である（Rao KP, Shanthi C., 1999, Biomaterials Appl 13: 238-268; および Grabenwoger M, Sider J, Fitzal F, et al., 1996, Ann Thorac Surg 62; 772-777）。天然の組織移植片の別の方法として、完全に無細胞とした組織マトリクスを生産することが試みられている。この生産は、石灰化を促進し、免疫学的応答を惹起すると考えられる細胞成分を特異的に除去することによる。これらの脱細胞化技術としては、化学的手段、酵素学的手段、および機械的手段での細胞成分の除去が挙げられる。この処理によって、本質的に細胞外マトリクス成分から構成される材料が残る。これらの脱細胞化組織は、天然の機械的特性を保持し、再生を促進する。再生は、宿主による新血管形成および再細胞化のプロセスによって生じる。代表的な細胞抽出方法である界面活性剤処理は、生体材料移植片として使用するために完全に脱細胞化され

た組織を作製する手段として実施されてきた。なぜなら、処理された組織内に残る細胞成分、脂質および残留界面活性剤は、石灰化のような所望されない効果を促進し得るからである (Valente M, Bortolotti U, Thiene G, , 1985, Am J Pathol 119, 12-21; Maranto AR, Shoen FJ, 1988, ASAIO Trans 34, 827-830; Courtman DW, Pereira CA, Kashaf V, McComb D, Lee JM, Wilson GL, 1994, J Biomed Mater Res 28:655-666; および Levy RJ, Schoen FJ, Anderson HC, et al., 1991, Biomaterials 12:707-714)。クロロホルム／メタノールまたはドデシル硫酸ナトリウム (SDS) のいずれかでの処理によるウシ心膜からの脂質除去は、ラットモデルにおいて組織の石灰化を減少させた (Jorge-Herrero E, Fernandez P, Gutierrez MP, Castillo-Olivares JL, 1991, Biomaterials 12:683-689)。最近、Sunjay et al. は、脱細胞化血管移植片が内皮前駆体細胞 (EPC) により皮質化 (cort) したことを実証した。なぜなら、これらの移植片は、十分に保存された細胞外マトリクスおよび動脈を含む天然の血管に類似する機械的特性を有するからである (Sunjay Kaushal, Gilad E. Amiel, Kristine J. Guleserian, et al. 2001, Nature Medicine Vol. 9, 1035-1040)。この研究者らは、末梢血から内皮前駆体細胞 (EPC) を単離し、そしてこのEPCを脱細胞化ウシ回腸血管に播種した。このEPCを播種した脱細胞化移植片は、130日目までにインビボで新生血管を発達させ、NO媒介される血管弛緩が生じた。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従来技術によって調製された脱細胞化組織は、脱細胞化率が悪く、脱細胞化率を上げると、機械的強度が失われて医療用途における使用に耐えないという問題点があった。また、従来技術によって調製された脱細胞化組織は、供給数が限

定されており、製品の強度が脆弱であることから、右心系に限られるという問題点も指摘されている。

#### 【0008】

多くの研究者が脱細胞化移植片の物理学的特性および生物学的特性を含む多数の有用性を認識している。しかし、現状で入手可能な脱細胞化移植片は、石灰化および免疫惹起反応のような欠点が存在し、さらなる改善が必要とされている (Christine E. Schmidt, Jennie M. Baier., 2000, Biomaterials 21:2215-2231)。また、上述の処理方法で製造された移植片中の残留界面活性剤は、脱細胞化組織マトリクスに吸収され、臨床適用において多大な問題を生じる。

#### 【0009】

##### 【課題を解決する手段】

本発明では、本発明者らは、まったく新しい脱細胞化技術を開示する。臨床適用における問題となる毒性の界面活性剤を使用しない細胞成分を除去するための新たな方法を提供する。本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、界面活性剤を使用しない脱細胞化のための方法を開発することに成功した。

#### 【0010】

上記課題は、提供された組織をミセル化しない両親媒性分子（例えば、1, 2-エポキシドポリマー）を含む溶液に浸すことによって達成された。従って、本発明は、生体外または生体内で心血管／血管用生体人工器官構築の足場 (scaffold) として使用するためにブタ大動脈弁組織を脱細胞化する新しい方法、組織、組織グラフト、およびそれらを利用する方法に関する。

#### 【0011】

本発明者らは、従来の界面活性剤を用いずに血管組織から細胞成分を抽出するための2工程の戦略を確立した。工程1では、ミセル化しない両親媒性分子（例えば、ポリエチレングリコール (PEG) のような1, 2-エポキシドポリマー）を使用して細胞質ゾルおよび細胞膜の抽出を行う。ポリエチレングリコール (PEG) のような1, 2-エポキシドポリマーは、細胞の内外を隔てる細胞膜を不安定化する効果があるため、細胞膜成分および細胞質ゾル（水溶性成分）の多

くが工程 1 により除去される。工程 2 では、抽出されたものから核酸成分を酵素で分解して析出させる。

#### 【0012】

本発明は、従来の界面活性剤を利用する方法とは、ミセル化しない両親媒性分子を含む溶液を利用するという点で根本的に異なる。従来の方法ではミセル形成する性質を有する界面活性剤が二相界面に強く吸着し、界面の自由エネルギーを著しく下げることによってタンパク質、脂質などの物質を除去していた。このような除去は、可溶化し洗い流すという発想に近い。このことにより、界面活性剤による不利な効果、たとえば、細胞強度が弱い、十分に細胞成分を除去することができないなどの欠点が存在した。

#### 【0013】

ミセル化しない両親媒性分子を使用することにより、これらの問題を克服することができた。この効果は、ミセル化しないことにより、細胞成分の抽出に似た機構により脱細胞化するというまったく新しい発想により達成されたものである。

#### 【0014】

このようにして作られた脱細胞化組織は、細胞外マトリクスに対する損傷を最小化されている。脱細胞化組織が永久に使える人工血管として使用することも可能である。また、本発明の技術によって調製された脱細胞化組織およびグラフトには、移植後に宿主由来の細胞が浸潤し置換することが認められた。このような事象はこれまで開発された組織グラフトでは決して起こらなかったことであり、このこと自体、本発明の予想外の極めて優れた効果を示すものといえる。

#### 【0015】

本発明の脱細胞化組織および組織グラフトを用いた宿主への移植の後に、その組織および組織グラフトにおいて宿主由来の細胞による細胞置換が起こっていることが明らかになった。このような細胞置換は、従来の組織グラフトでは全く観察されなかったことであり、本発明の脱細胞化組織および組織グラフトは、永久に使用することができるものであるといえる。このような効果は、従来技術では決して達成することができなかった予想外の効果であり、このような脱細胞化組

組織および組織グラフトを提供することができたという事実は、移植医学において格別の進歩をもたらすといえ、その意義は筆舌に尽くしがたい。

【0016】

従って、本発明は、以下を提供する。

(1) 脱細胞化組織であって、

1) その組織の細胞残存率は、生体内において免疫反応を惹起するレベル未満であり、かつ

2) その組織はその組織が未処理状態で有する機能を発揮するのに支障があるような損傷を受けていない、

脱細胞化組織。

(2) 上記組織の細胞残存率は、30%以下である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(3) 上記組織の組織損傷率は、30%以下である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(4) 上記組織は、臨床適用することができる組織強度を有する、項目1に記載の脱細胞化組織。

(5) 上記組織は、その組織が未処理状態の組織強度の80%以上の細胞強度を有する、項目1に記載の脱細胞化組織。

(6) 上記組織は、その組織が未処理状態の $\beta$ 値の80%以上の細胞強度を有する、項目1に記載の脱細胞化組織。

(7) 20以上の $\beta$ 値の細胞強度を有する、項目1に記載の脱細胞化組織。

(8) 上記組織は、管状組織である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(9) 上記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択されるものの組織である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(10) 上記組織は、哺乳動物由来である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(11) 上記組織は、ヒト由来である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(12) 上記組織は、ブタ由来である、項目1に記載の脱細胞化組織。

(13) 組織グラフトであって、

1) 項目1に記載の脱細胞化組織であって、その脱細胞化組織には、レシピア

ント由来の細胞が播種され、培養されて、所望の組織の構造が形成されている、脱細胞化組織、を含む、組織グラフト。

(14) 上記脱細胞化組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択される器官の組織である、項目13に記載の組織グラフト。

(15) 上記組織は、哺乳動物由来である、項目13に記載の組織グラフト。

(16) 上記組織は、ヒト由来である、項目13に記載の組織グラフト。

(17) 上記細胞は、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、血球ならびにこれらに分化する前駆細胞および体性幹細胞からなる群より選択される、項目13に記載の組織グラフト。

(18) 膜状組織グラフトであって、

1) 項目3に記載の脱細胞化組織であって、その脱細胞化組織には、レシピエント由来の細胞が播種され、培養されて、所望の組織の構造が形成されている、脱細胞化組織、を含む、膜状組織グラフト。

(19) 脱細胞化組織を生産する方法であって、

1) 組織を提供する工程；および

2) その組織を、ミセル化しない両親媒性分子を含む溶液に浸す工程、を包含する、方法。

(20) さらに、

3) 上記組織を洗浄する工程、を包含する、項目19に記載の方法。

(21) 上記洗浄は、PBSで行われる、項目20に記載の方法。

(22) 上記ミセル化しない両親媒性分子は、1, 2-エポキシドポリマーである、項目19に記載の方法。

(23) 上記ミセル化しない両親媒性分子は、ポリエチレングリコール(PEG)である、項目19に記載の方法。

(24) 上記PEGの平均分子量は、200と6000との間である、項目2

3に記載の方法。

(25) 上記PEGの平均分子量は、1000と2000との間である、項目23に記載の方法。

(26) 上記PEGの平均分子量は、1500と2000との間である、項目23に記載の方法。

(27) 上記PEGの平均分子量は、1000以下である、項目23に記載の方法。

(28) 上記浸す工程は、30分間～60分間行われる、項目19に記載の方法。

(29) 上記浸す工程は、物理的な処理をさらに包含する、項目19に記載の方法。

(30) 上記洗浄する工程は、3日間～5日間行われる、項目20に記載の方法。

(31) 上記ミセル化しない両親媒性分子は、生体適合性である、項目19に記載の方法。

(32) 上記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織である、項目19に記載の方法。

(33) 上記組織は、哺乳動物由来である、項目19に記載の方法。

(34) 上記組織は、ヒト由来である、項目19に記載の方法。

(35) さらに、

4) 化学的処理を行う工程、  
を包含する、項目19または20に記載の方法。

(36) 上記化学的処理は、DNaseによる処理である、項目35に記載の方法。

(37) 上記化学的処理は、DNase Iによる処理である、項目35に記載の方法。

(38) 項目19に記載の方法によって得られる、脱細胞化組織。

(39) 組織の再生方法であって、

1) 項目1に記載の脱細胞化組織を提供する工程；

- 2) その脱細胞化組織に細胞を提供する工程;
  - 3) その細胞の分化を誘導する生理活性物質を提供する工程; および
  - 4) その細胞の分化が生じるに十分な時間インキュベートする工程、
- を包含する、方法。

(40) 上記細胞は、血管細胞または血管様細胞である、項目39に記載の方法。

(41) 上記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織である、項目39に記載の方法。

(42) 上記組織と上記細胞とは、同じ宿主由来である、項目39に記載の方法。

(43) 上記組織と上記細胞とは、同種異系宿主由来である、項目39に記載の方法。

(44) 上記組織と上記細胞とは、異種宿主由来である、項目39に記載の方法。

(45) 上記細胞は、レシピエント由来である、項目39に記載の方法。

(46) 組織グラフトを生産する方法であって、

- 1) 項目1または38に記載の脱細胞化組織を生体内に提供する工程;
  - 2) その脱細胞化組織にその生体の自己細胞を侵入させる工程; および
  - 3) その細胞の分化が生じるに十分な時間インキュベートする工程、
- を包含する、方法。

(47) 上記細胞は、血管細胞または血管様細胞である、項目46に記載の方法。

(48) 上記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織である、項目46に記載の方法。

(49) 上記組織は、自己由来である、項目46に記載の方法。

(50) 上記組織と上記細胞とは、同種異系宿主由来である、項目46に記載の方法。

(51) 上記組織と上記細胞とは、異種宿主由来である、項目46に記載の方法。



(52) さらに、

4) 上記細胞の分化を誘導する生理活性物質を提供する工程、  
を包含する、項目46に記載の方法。

(53) 上記生理活性物質は、造血活性を有するサイトカインである、項目52に記載の方法。

(54) 項目46に記載の方法によって生産された、組織グラフト。

(55) 組織または臓器移植を必要とするかまたはその危険にある被験体の処置または予防の方法であって、

1) 項目1もしくは38に記載の脱細胞化組織または項目8に記載の組織グラフトを提供する工程；および

2) その脱細胞化組織または組織グラフトを被験体に移植する工程、  
を包含する、方法。

(56) 上記組織は、上記被験体由来である、項目55に記載の方法。

(57) 上記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択されるものの組織である、項目55に記載の方法。

(58) 上記被験体は、哺乳動物である、項目55に記載の方法。

(59) 上記被験体は、ヒトである、項目55に記載の方法。

(60) 臓器移植のための医薬であって、

1) 項目1もしくは38に記載の脱細胞化組織または項目8に記載の組織グラフト、  
を含む、医薬。

(61) 上記組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択されるものの組織である、項目60に記載の医薬。

(62) 上記細胞は、哺乳動物由来である、項目60に記載の医薬。

(63) 上記組織は、ヒト由来である、項目60に記載の医薬。

(64) 上記組織は、上記移植を必要とする被験体由来である、項目60に記載の医薬。

(65) 上記組織は、ブタ由来である、項目60に記載の医薬。

(66) 臓器移植のための医薬を製造するための、項目1もしくは38に記載

の脱細胞化組織または項目 13 に記載の組織グラフトの、使用。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

#### 【0018】

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

#### 【0019】

本明細書において使用される「再生」(regeneration)とは、個体の組織の一部が失われた際に残った組織が増殖して復元される現象をいう。動物種間または同一個体における組織種に応じて、再生のその程度および様式は変動する。ヒト組織の多くはその再生能が限られており、大きく失われると完全再生は望めない。大きな傷害では、失われた組織とは異なる増殖力の強い組織が増殖し、不完全に組織が再生され機能が回復できない状態で終わる不完全再生が起こり得る。この場合には、生体内吸収性材料からなる構造物を用いて、組織欠損部への増殖力の強い組織の侵入を阻止することで本来の組織が増殖できる空間を確保し、さらに細胞増殖因子を補充することで本来の組織の再生能力を高める再生医療が行われている。この例として、軟骨、骨および末梢神経の再生医療がある。神経細胞および心筋は再生能力がないかまたは著しく低いとこれまでは考えられてきた。近年、これらの組織へ分化し得る能力および自己増殖能を併せ持った組織幹細胞(体性幹細胞)の存在が報告され、組織幹細胞を用いる再生医療への期待が高まっている。胚性幹細胞(ES細胞)はすべての組織に分化する能力をもった細胞であり、それを用いた腎臓、肝臓などの複雑な臓器の再生が試みられているが実現には至っていない。

#### 【0020】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離

する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本発明の方法においては、どのような細胞でも対象とされ得る。本発明で使用される「細胞」の数は、光学顕微鏡を通じて計数することができる。光学顕微鏡を通じて計数する場合は、核の数を数えることにより計数を行う。当該組織を組織切片スライスとし、ヘマトキシリン-エオシン（HE）染色を行うことにより細胞外マトリクスおよび細胞に由来する核を色素によって染め分ける。この組織切片を光学顕微鏡にて検鏡し、特定の面積（例えば、200 mm×200 mm）あたりの核の数を細胞数と見積って計数することができる。

#### 【0021】

細胞は、石灰化および免疫反応惹起の原因となる。従って、組織または臓器の移植のためには、自己由来以外の細胞はできるだけ除去されるべきであり、自己由来の細胞の場合も、通常は免疫拒絶の問題もないことから脱細胞化の必要はないが、脱細胞化が好ましい場面もあることから、できるだけ除去されるべきである。

#### 【0022】

本明細書において「細胞の置換」とは、脱細胞化された組織内で、もとあった細胞に代わり、別の細胞が侵入し置き換わることをいい、細胞の浸潤ともいう。好ましくは、本発明では、細胞の置換は、移植された宿主の細胞によって行われる。本発明の技術によって調製された脱細胞化組織およびグラフトには、移植後に宿主由来の細胞が浸潤し置換することが認められた。このような事象はこれまで開発された組織グラフトでは決して起こらなかったことであり、このこと自体、本発明の予想外の極めて優れた効果を示すものといえる。

#### 【0023】

本明細書において「組織」（tissue）とは、細胞生物において、同一の機能・形態をもつ細胞集団をいう。多細胞生物では、通常それを構成する細胞が分化し、機能が専能化し、分業化がおこる。従って細胞の単なる集合体であり得ず、ある機能と構造を備えた有機的細胞集団、社会的細胞集団としての組織が構成されることになる。組織としては、外皮組織、結合組織、筋組織、神経組織などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明が対象とする組織は、生物のど

の臓器または器官由来の組織でもよい。本発明の好ましい実施形態では、本発明が対象とする組織としては、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨の組織が挙げられるがそれらに限定されない。本発明で用いられるミセル化しない両親媒性分子は、細胞成分の抽出に類似する機構で作用することから、原理的にはどの器官由来の組織でも本発明の方法によって処理され得る。

#### 【0024】

本明細書において「膜状組織」とは、「平面状組織」ともいい、膜状の組織をいう。膜状組織には、心膜、硬膜、角膜などの器官の組織が挙げられる。

#### 【0025】

本明細書において「臓器」または「器官」(organ)とは、互換的に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物(例えば、動物、植物)では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする器官は、虚血性の器官(心筋梗塞を起こした心臓、虚血を起こした骨格筋など)が挙げられる。1つの好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨である。別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、心臓弁、心膜および血管である。

#### 【0026】

移植するための適切な移植片を調製するためには、必要に応じて器官培養をすることが望ましくあり得る。器官培養とは、生体から摘出した胚器官あるいは成熟器官の一部あるいは全体を、その構造、機能および分化能を保持したまま、インビトロで培養することをいう。これに対し、一般の組織培養では、細胞増殖を主たる目的とするために、むしろ脱分化を起こしやすい。器官培養としては、時計皿法、ブロックシャーレ法、支持台法、スポンジ基質法、Trowell法などがあるがこれらに限定されない。Rose、久米川によって開発された循環式器官培養法(circulation type organ culture)などもある。本発明の脱細胞化方法によって調製された器官または組織を培養

培地にいれ、その器官培養培地に種々の物質を加えることによって、構造、機能および発育分化への調整、ならびに器官対器官の相互作用などの調節を行うことができる。

#### 【0027】

本明細書において「脱細胞（化）」および「脱細胞（化）する」とは、組織または器官から細胞を除去することをいう。好ましくは、脱細胞化はもとの組織または器官の構造および機能を損傷することなく行われ得る。脱細胞化が行われた組織からは、細胞質成分、細胞質ゾル成分、細胞骨格および細胞膜成分は除去されているが、細胞外マトリクス（ECM）成分など、組織の構造を保持するために必要な細胞の成分は未変性のまま保持されている。したがって、脱細胞化された組織または器官は、組織または器官の形状、力学的強度、弾性、柔軟性などの諸性質は未処理の組織または器官と実質的に同等であることが好ましい。また、移植後には細胞外マトリクスが未変性であるために、レシピエント側の細胞の侵入、接着、増殖、分化形質の発現、維持に好適な環境を提供し、自己細胞により構成される組織に置き換わることが好ましい。脱細胞化の程度は、細胞残存率を指標に測定することができる。

#### 【0028】

脱細胞化された組織は、MHCクラスIおよびIIタンパク質が除去されていることが好ましい。このようなMHCクラスIおよびIIタンパク質は、SDS PAGEおよび／またはウェスタンブロット分析により確認することができる。他の細胞外マトリクスタンパク質もまた、SDS PAGEおよび／またはウェスタンブロット分析により確認することができる。細胞中の構造タンパク質（コラーゲン、エラスチンなど）はアミノ酸分析（例えば、エドマン分解法など、あるいはPE Biosystemsから入手可能なペプチド分析機器による自動分析など）により評価することができる。その結果により、脱細胞化プロセスのECMへの影響を判断することができる。細胞膜および細胞中に含まれる脂質およびリン脂質は、薄層クロマトグラフィーおよびHPLCを用いて分析することができる。糖鎖（例えば、グリコサミノグリカンなど）は、アガロースゲル電気泳動などにより分析することができる。この分析により、細胞外マトリクスの

グリコサミノグリカン組成のほか、 $\alpha$ -Galなどの存在も分析することができる。

### 【0029】

本明細書において「細胞残存率」とは、本発明の方法により組織の脱細胞化を行った後に残る生存細胞の、その組織にもともと存在していた細胞に対する比率をいう。本明細書において細胞残存率を測定する方法は、ヘマトキシリンおよびエオシン染色（H & E 染色）による顕微鏡による計数法が代表的に用いられ、この方法は、H E 染色により染め分けた核を光学顕微鏡により検鏡により計数することを利用する。従って、この方法は例えば、以下の工程を包含する：サンプルをH E 染色により染め分ける工程；このサンプルにおいて100mm×100mmの面積に存在する核の数（＝細胞数）を計数する工程；必要に応じて計数を複数（例えば、8回）行い、その平均を取る工程；コントロール（例えば、未処理の組織を100%とする）に対する割合を算出する工程を包含する。コントロールに対する割合は、例えば、未処理組織に対する残存核の割合を細胞残存率とすることができる。従って、この場合、細胞残存率（%）＝（処理組織中の核の数）／（未処理組織中の核の数）×100で算出することができる。細胞残存率はまた、残存するDNA量を測定することによっても測定することができる。細胞が有するDNAの量の組織における総量は、一般に組織における細胞数に比例することが知られているからである。DNAを測定する方法は、当該分野において公知であり、例えば、Molecular Probes社のHoechst 33258などの蛍光試薬を用いて組織より抽出したDNA量を定量することができる。具体的には、組織を破碎超音波処理などでゾル化し、緩衝液中DNA成分に特異的に結合し、かつ蛍光能を発生させるHoechst 33258（Ex（励起波長）356、EM（発光波長）492）を反応させ、抽出上清中のDNA量を蛍光強度として測定し、定量することができる。ある組織の細胞残存率が「生体内において免疫反応を惹起するレベル未満」であるとは、その組織を生体内に移入したときに、一定期間（好ましくは、永久に）免疫反応が惹起しないことをいう。

### 【0030】

本明細書において「免疫反応」とは、移植片と宿主との間の免疫寛容の失調による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応（移植後数分以内）（ $\beta$ -Galなどの抗体による免疫反応）、急性拒絶反応（移植後約7～21日の細胞性免疫による反応）、慢性拒絶反応（3カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応）などが挙げられる。

#### 【0031】

本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中への細胞（免疫系）浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

#### 【0032】

本明細書において「石灰化」とは、生物体で石灰質が沈着することをいう。

#### 【0033】

本明細書において生体内で「石灰化する」かどうかは、カルシウム濃度を測定することによって判定することができ、移植組織を取り出し、酸処理などにより組織切片を溶解させ、その溶液を原子吸光度などの微量元素定量装置により測定し、定量することができる。

#### 【0034】

本明細書において「生体内」または「インビボ」(in vivo)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする組織または器官が配置されるべき位置をいう。

#### 【0035】

本明細書において「インビトロ」(in vitro)とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」（例えば、試験管内に）摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

#### 【0036】

本明細書において「エキソビボ」とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より抽出し、インビトロで治療遺伝子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソビボという。

## 【0037】

本明細書においてある組織の「未処理状態で有する機能」とは、その組織が正常状態で生体内で有する機能をいう。従って、例えば、心臓弁の場合、通常心室から心房または肺動脈および大動脈から心房へ血液の逆流を防ぐ機能を有することから、心臓弁が未処理状態で有する機能とは、心室から心房または肺動脈および大動脈から心房へ血液の逆流を防ぐ機能をいう。

## 【0038】

本明細書において「細胞外マトリクス」(ECM)とは「細胞外基質」とも呼ばれ、上皮細胞、非上皮細胞を問わず体細胞(somatic cell)の間に存在する物質をいう。細胞外マトリクスは、組織の支持だけでなく、すべての体細胞の生存に必要な内部環境の構成に関与する。細胞外マトリクスは一般に、結合組織細胞から産生されるが、一部は上皮細胞や内皮細胞のような基底膜を保有する細胞自身からも分泌される。線維成分とその間を満たす基質とに大別され、線維成分としては膠原線維および弾性線維がある。基質の基本構成成分はグリコサミノグリカン(酸性ムコ多糖)であり、その大部分は非コラーゲン性タンパクと結合してプロテオグリカン(酸性ムコ多糖-タンパク複合体)の高分子を形成する。このほかに、基底膜のラミニン、弾性線維周囲のミクロフィブリル(microfibril)、線維、細胞表面のフィブロネクチンなどの糖タンパクも基質に含まれる。特殊に分化した組織でも基本構造は同一で、例えば硝子軟骨では軟骨芽細胞によって特徴的に大量のプロテオグリカンを含む軟骨基質が産生され、骨では骨芽細胞によって石灰沈着が起こる骨基質が産生される。

## 【0039】

本明細書において「組織損傷率」とは、組織または器官の機能を示すパラメータをいい、処理後の組織または器官がどの程度損なわれ傷ついているかの指標であり、その組織または器官の本来の機能を発揮することができるかどうかの指標である。本明細書において組織損傷率を測定する方法は、当該分野において公知であり、例えば、エラスチン断裂部位を計数することによって判定することができる。本明細書において用いられる方法では、一視野を $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ ごとのユニットに区切り、ユニットを単位としてエラスチン断裂部位がある場合



にカウントして算出した。一視野あたり 24 ユニットが存在した。HE 染色により組織切片における細胞外マトリクスの検鏡により計数し、未処理組織を 0 % となるように規定し、損傷率 =  $x / 24$  で算出する。この場合未処理を  $x = 0$  として規定する。

#### 【0040】

本明細書において「組織強度」とは、組織または器官の機能を示すパラメータをいい、その組織または器官の物理的強度であり、一般に、引っ張り強さを測定することにより判定することができる。そのような一般的な引っ張り試験は周知であり本明細書においては詳細には説明しない。一般的な引っ張り試験によって得られたデータの解析により、破断強度、剛性率、ヤング率などの種々のデータを得ることができ、そのような値もまた、本明細書において組織強度の指標として用いることができる。本明細書において管状組織の場合、組織強度は、剛性パラメータ ( $\beta$  値) で表現することができる。 $\beta$  値は、P-D (圧力-直径) 関係を作成した後、

$$\ln(P/P_s) = \beta(D/D_s - 1) \quad (1)$$

で算出することができる。P<sub>s</sub> および D<sub>s</sub> は、100 mmHg での標準値を示す。P および D 各々の P (圧力) における直径 (D) の値を示す。

#### 【0041】

血管などの管状組織の両端をパイプ状のユニットに固定し、生理食塩水中に内室および外室を満たす。この状態から、内室へ圧力を外武装置より加えていくと同時に、その加圧時の外径をモニタリングする。その測定によって得られる圧力と、外径との関係を上記 (1) の式に導入して、 $\beta$  値を算出する (Sonoda H, Takamizawa K., et al. J. Biomed. Mater. Res. 2001: 266-276)。

#### 【0042】

本明細書において「両親媒性分子」とは、親水基 (カルボキシ基、硫酸基、第 4 アンモニウム基、ヒドロキシ基など) および疎水基 (親油基ともいう。長鎖の炭化水素基など) の両方を有する分子をいう。極性溶媒および無極性溶媒のいずれにもなじむ。この性質を両親媒性 (amphiphilic) という。

## 【0043】

本明細書において「界面活性剤」とは、液体に溶けて表面張力を著しく低下させる作用を有する物質をいう。分子内に親水性部分と疎水性部分とが分れて存在することから、界面に吸着しやすく、また一定の濃度（臨界ミセル濃度）以上ではミセルとよばれる分子集合体を形成する。本明細書において「ミセル」とは、界面活性剤など両親媒性分子を水に溶かすと、ある濃度以上で親水基を外に親油基を内に向けて会合したものをいう。ミセルの形成はある濃度で突然に起こり、この濃度を「臨界ミセル濃度」といい、この濃度を境として水溶液の性質は顕著に変化する。このミセル形成によって、界面活性剤の親水親油バランスにより二相界面に分子が強く吸着し、界面の自由エネルギーを顕著に下げることによってタンパク質、脂質などの細胞成分を可溶化する作用を奏する。脱細胞化に使用される界面活性剤は、一般に臨界ミセル濃度以上の濃度で使用され（例えば、1%）、したがって、自由エネルギーの下降による機構によって脱細胞化処理が達成されている。

## 【0044】

本明細書において「ミセル化しない」とは、所定の濃度で上述のミセルを形成しない、両親媒性分子の性質をいう。好ましくは、ミセル化しない性質は、どの濃度でも保有され得る。本発明において用いられる物質（例えば、ポリエチレングリコール単体）は、臨界ミセル濃度を水溶液中において有することはないことが望ましい。

## 【0045】

本明細書において「ミセル化しない両親媒性分子」とは、所定の濃度でミセルを形成しない両親媒性分子をいう。好ましくは、そのような分子は水溶液として存在し得る濃度において臨界ミセル濃度を有せず、したがってすべての濃度にわたってミセル化しない。ミセル化しない両親媒性分子を使用する場合、脱細胞化処理は、化学的に抽出するという技法を利用する細胞成分の抽出に類似した機構で行われ得る。したがって、ミセル化しない両親媒性分子溶液による脱細胞化処理は、界面活性剤による脱細胞化処理とは、異なる。その結果、組織の損傷度合いに顕著な相違が生じる。本明細書において、脱細胞化処理は、ミセル化しない

両親媒性分子であればどのような分子を使用してもよいが、好ましくは、1, 2-エポキシドポリマーが使用され、特にポリエチレングリコールが用いられる。

#### 【0046】

本明細書において「1, 2-エポキシドポリマー」とは、モノマーとしての1, 2-エポキシドが重合して形成されるポリマーをいう。1, 2-エポキシドポリマーとしては、エチレンオキシドポリマーまたはそのコポリマー（共重合体）、プロピレンオキシドまたはそのコポリマー（共重合体）、およびそれを超える高級1, 2-エポキシドポリマーまたはそのコポリマーが挙げられるがそれらに限定されない。1, 2-エポキシドとは、分子内ですでに結合している2つの炭素原子に酸素原子が結合する構造をもつ化合物であって、1位と2位とに酸素原子が結合しているものをいう。1, 2-エポキシドの例としては、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、ブチレンオキシド、エピクロロヒドリンなど挙げられるそれらに限定されない。1, 2-エポキシドポリマーとしては、エチレンオキシドポリマー、プロピレンオキシドポリマー、それらのコポリマー、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、1, 2-エポキシドポリマーは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールなどがあるがそれらに限定されない。もっとも好ましくは、1, 2-エポキシドポリマーは、ポリエチレングリコールである。好ましくは、1, 2-エポキシドポリマーは、両親媒性を有する。

#### 【0047】

本明細書において「ポリエチレングリコール (PEG)」とは、エチレングリコールのポリマーをいい、ポリエチレンオキシド (poly (ethylene oxide)) ともいわれ、 $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$ で表される。ポリエチレングリコールは、種々の企業から市販されており、例えば、Union Carbide (Carbowax)、Dow (Polyglycol E)、Texaco Chemical (Jeffox)、Olin (PolyG)、BASF Wyandotte (Pluracol E)、Hodag、ICI Americas (ATEG)、Nacalai tesque、日本油脂などから市販されている。通常、PEGは、平均分子量が200と6000と

の間である。そのようなPEGとしては、Nacalai tesqueのpolyethylene glycol ( $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ ) #分子量 (例えば、200、600、1000、2000、6000) のような製品が挙げられる。好ましくはPEGは、平均分子量が1000と2000との間である。別の好ましい実施形態では、PEGは、平均分子量が1000以下であり得る。より好ましくはPEGは、平均分子量が1500と2000との間であり得る。このようにPEGは市販されているが、所望の特性を達成するために、適宜合成することもできる。そのような合成方法は当該分野において周知である。なお、本明細書において平均分子量および分子量は、ダルトン (Dalton) であらわす。本発明において使用されるPEGは、分子が均質であることが好ましいが、そのことは必須ではなく、平均分子量が一定範囲にあれば通常使用することができる。本発明において脱細胞化を調製するために、PEG以外の化学物質 (例えば、酵素 (例えばDNase I など)、酵素阻害剤などを含むがそれらに限定されない) を加えることができる。PEG以外の化学物質を加えると、加えるべきPEGの量または濃度は、その化学物質の存在量に応じて変動し得る。好ましくは、細胞融合などで用いられる濃度がよく、例えば、 $1\text{ g/ml}$  以上 ( $100\text{ w/w}$  以上) の濃度が好ましいが、それに限定されない。

#### 【0048】

本明細書において「浸す」とは、ある物体をある流体 (例えば、液体) の中に入れることをいう。本発明においては、処理すべき組織を、処理のための本発明のミセル化しない両親媒性分子 (例えば、ポリエチレングリコールのような1, 2-エポキシドポリマー) 含有溶液に入れることを「浸す」という。従って、浸す工程は、好ましくは、処理すべき組織が処理のための溶液中に完全に浸透するように行われる。また、浸す工程においては、好ましくは、除去すべき成分の除去を効率的に行うために、物理的な処理 (例えば、ガラス棒でしごく) を行ってもよい。

#### 【0049】

本明細書において「洗浄する」工程は、本発明のミセル化しない両親媒性分子 (例えば、1, 2-エポキシドポリマー) を含む溶液に浸す工程によって処理さ

れた組織からその溶液を取り除くことをいう。従って、好ましくは、洗浄する工程は、液体を用いて行われる。本発明においては、処理された組織は、生体での使用が企図されることから、生理的に受容可能な液体で洗浄されることが好ましい。1つの好ましい実施形態では、洗浄する工程は、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）を用いて行われ得る。洗浄液には、必要に応じて他の薬剤（例えば、プロテアーゼ阻害剤）が含まれていてもよいが、そのような他の薬剤は、毒性を示さず生体適合性であることが好ましい。

#### 【0050】

本明細書において「化学的処理」とは、広義には、ある物体を化学物質で処理（例えば、浸すことによる）することをいう。ただし、本明細書において使用される場合、化学的処理は、必須工程としての1, 2-エポキシドポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）を含む溶液に浸す工程以外の他の工程を指す。従って、本発明の方法において、例えば、平均分子量が1000-2000のポリエチレングリコール含有溶液に浸す工程の他に化学的処理が施される場合、化学的処理は、平均分子量が1000-2000のポリエチレングリコール含有溶液以外の溶液（例えば、DNase I 溶液での処理、グルタルアルデヒド溶液、他の平均分子量を有するポリエチレングリコール溶液、他の1, 2-エポキシドポリマー溶液などを含むがそれらに限定されない）に浸す工程を包含する。

#### 【0051】

本明細書において「生理活性物質」（physiologically active substance）とは、細胞または組織に作用する物質をいう。生理活性物質には、サイトカインおよび増殖因子が含まれる。生理活性物質は、天然に存在するものであっても、合成されたものでもよい。好ましくは、生理活性物質は、細胞が産生するものまたはそれと同様の作用を有するものである。本明細書では、生理活性物質はタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

#### 【0052】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられ

る最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制禦作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

#### 【0053】

本明細書において用いられる「増殖因子」または「細胞増殖因子」とは、本明細書では互換的に用いられ、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。

#### 【0054】

サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝実質細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) のような増殖活性を有するものが挙げられる。

#### 【0055】

サイトカインおよび増殖因子などの生理活性物質は一般に、機能重複現象 (redundancy) があることから、他の名称および機能で知られるサイトカインまたは増殖因子であっても、本発明に使用される生理活性物質の活性を有する限り、本発明において使用され得る。また、サイトカインまたは増殖因子は、本明細書における好ましい活性を有してさえいれば、本発明の治療法または医薬の好ましい実施形態において使用することができる。

#### 【0056】

本明細書において「分化」とは、細胞、組織または器官のような生物の部分の

状態の発達過程であって、特徴のある組織または器官を形成する過程をいう。「分化」は、主に発生学 (e m b r y o l o g y)、発生生物学 (d e v e l o p m e n t a l b i o l o g y) などにおいて使用されている。1 個の細胞からなる受精卵が分裂を行い成体になるまで、生物は種々の組織および器官を形成する。分裂前または分裂が十分でない場合のような生物の発生初期は、一つ一つの細胞や細胞群が何ら形態的または機能的特徴を示さず区別することが困難である。このような状態を「未分化」であるという。「分化」は、器官のレベルでも生じ、器官を構成する細胞がいろいろの違った特徴的な細胞または細胞群へと発達する。これも器官形成における器官内での分化という。従って、本発明における再生では、細胞の分化とは、その細胞が処理前には持っていなかった何らかの形態的または機能的な特徴を有するようになることをいう。そのような例としては、心臓弁の場合、細胞として幹細胞 (例えば、胚性幹細胞または組織幹細胞) を提供したとき、心臓弁に存在する細胞または組織と少なくとも部分的に同様の携帯または機能をその細胞が有するようになることが挙げられる。

#### 【0057】

本明細書において「移植片」、「グラフト」および「組織グラフト」は、交換可能に用いられ、身体の特定部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となるものをいう。移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓弁、心膜、硬膜、角膜骨片、歯などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが包含される。移植片としては、そのドナー (d o n o r) の種類によって、自己 (自家) 移植片 (a u t o g r a f t)、同種移植片 (同種異系移植片) (a l l o g r a f t)、異種移植片が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0058】

本明細書において自己移植片または自家移植片とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する移植片をいう。本明細書において自己移植片というときは、広義には遺伝的に同じ他個体 (例えば一卵性双生児) からの移植片をも含む得る。

## 【0059】

本明細書において同種移植片（同種異系移植片）とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される移植片をいう。遺伝的に異なることから、同種異系移植片は、移植された個体（レシピエント）において免疫反応を惹起し得る。そのような移植片の例としては、親由来の移植片などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0060】

本明細書において異種移植片とは、異種個体から移植される移植片をいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ブタからの移植片は異種移植片という。

## 【0061】

本明細書において「レシピエント」（受容者）とは、移植片または移植体を受け取る個体といい、「宿主」とも呼ばれる。これに対し、移植片または移植体を提供する個体は、「ドナー」（供与者）という。

## 【0062】

本発明の脱細胞化技術を用いれば、どのような移植片も使用することができる。なぜなら、本発明の方法により脱細胞化された移植片（例えば、組織、器官など）は、治療目的に損傷のない程度の組織損傷率を保持しつつ（すなわち、低く保ちながら）、免疫反応惹起、石灰化などの副作用が顕著に抑えられているからである。従って、従来自己移植片にしか用いることができなかった状況においても、同種異系移植片または異種移植片を用いることが可能になったことは、従来技術では達成することができなかった本発明の格別の効果の一つといえる。

## 【0063】

本明細書において「被験体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被験体は好ましくは、ヒトであり得る。

## 【0064】

本発明の方法または組織グラフトで必要に応じて使用される細胞は、同系由来（自己（自家）由来）でも、同種異系由来（他個体（他家）由来）でも、異種由来でもよい。拒絶反応が考えられることから、自己由来の細胞が好ましいが、拒



絶反応が問題でない場合同種異系由来であってもよい。また、拒絶反応を起こすものも必要に応じて拒絶反応を解消する処置を行うことにより利用することができる。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学体系、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて（改訂第3版）に記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、「シクロスポリン」（サンディミュン／ネオーラル）、「タクロリムス」（プロGRAF）、「アザチオプリン」（イムラン）、「ステロイドホルモン」（プレドニン、メチルプレドニン）、「T細胞抗体」（OKT3、ATGなど）があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリン、ステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本発明の医薬と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は本発明の再生・治療方法の前または後にも投与され得る。

#### 【0065】

本発明で用いられる細胞は、どの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の細胞でもよい。好ましくは、脊椎動物由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。

#### 【0066】

本発明が対象とする被験体と、脱細胞化された組織との組合せとしては、例えば、心疾患（例えば、虚血性心疾患）を起こした心臓への移植、心膜ペッチ、脳外科手術時の硬膜移植、心筋梗塞、下肢、上肢などへの血管移植、骨折、骨欠損を有する患者への骨の移植、損傷した角膜を有する患者に本発明の角膜を移植することなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0067】

本発明が対象とする組織は、生物のどの臓器または器官でもよく、また、本発明が対象とする組織は、どのような種類の生物由来であり得る。本発明が対象と

する生物としては、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。好ましくは、本発明が対象とする生物は、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）である。より好ましくは、本発明が対象とする生物は、霊長類である。最も好ましくは、本発明はヒトを対象とする。

#### 【0068】

自己細胞を用いた血管再生療法が注目されており、組織を移植する方法自体は当該分野において周知のとおり実施することができる。心臓血管外科領域では多種の人工弁や人工血管が用いられているが、その耐久性や抗凝固療法の必要性和それに付随する出血傾向、易感染性など多くの問題が挙げられており、再生医工学に期待が寄せられている。新岡らは肺動脈欠損症の4歳の女兒に対して、患者の足の静脈より得られた血管平滑筋細胞を生体内吸収性高ポリマー上に培養して再生血管を作製し、再生血管移植を行った（新岡俊治、今井康晴、瀬尾和宏ほか；テッシュエンジニアリングによる心血管材料の開発、応用。日心臓血管外会誌2000；29：38）。心血管系における組織工学（tissue engineering）では、移植された細胞、構造物が血管内の血液に直接接触が可能で、移植直後から酸素、栄養物の供給が得られ有利な条件であると考えられている。特に、自己細胞化（細胞置換）することの利点は以下のように多岐にわたる。

#### 【0069】

1. 拒絶反応の可能性を除去
2. ドナーを考慮する必要がない
3. 生きた組織のため長い耐久性が期待できる
4. 細胞が細胞外間質を完成させた時点で足場としてのポリマーが完全に生分解され移植後長期的に異物が全く残存しない。

#### 【0070】

5. 最終的内皮で覆われるため抗血栓性にもすぐれており、移植後、抗凝固療法を必要としない。

#### 【0071】

6. 自己組織のため成長が期待できる、などが考えられる。

## 【0072】

現段階では主に肺動脈圧程度の血圧範囲内で右心系において用いられているが、大動脈圧内での使用、または弁組織、ACバイパス用動脈グラフト、腱索組織などへの応用も当業者が適宜おこなうことができる（循環器疾患の最新治療 2002-2003；南江堂 p 29）。

## 【0073】

人工弁の一般的使用について、当該分野において周知であり、本発明もまたこの周知事項に基づいて実施することができる。例えば、ステントレス異種生体弁について知られている。異種生体弁では、ステントの存在で有効な弁口面積が小さくなり、また弁葉の石灰化や変性が問題であった。最近、ブタ大動脈基部の形態を生かし、ステントを用いないステントレス異種生体弁が大動脈弁位の人工弁として注目されている（Gross C et al, Ann Thorac Surg 68:919, 1999）。ステントがないことで、小さいサイズの弁を使用せざるを得ない場合でも弁を介した圧較差が少なく、術後の左心室肥大に対しても有効であると考えられている。また大動脈の基部の弾性が維持され、弁尖にかかるストレスが少なくステント付き生体弁に比較して耐久性の向上も期待できる。さらに、感染による心内膜炎、人工弁感染時にも使用が可能である。現在欧米でのステントレス異種生体弁の中期術後成績は十分に満足できる報告がなされており、長期成績にも期待できる（Gross C et al, Ann Thorac Surg 68:919, 1999）。

## 【0074】

（好ましい実施形態の説明）

1つの局面において、本発明は、脱細胞化組織を提供する。本発明の脱細胞化組織は、1) その組織の細胞残存率は、生体内において免疫反応を惹起するレベル以下であり；かつ2) その組織は、その組織が未処理状態で有する機能を発揮するのに支障があるような損傷は受けていない。組織内に残存する細胞は、石灰化の原因となり、しかも、自己由来以外の組織を移植する場合は、残存する細胞が所望されない免疫反応を惹起する可能性があることから、本発明の脱細胞化組織では、生体内において免疫反応を惹起するレベルより低くある必要がある。ま

た、細胞はできる限り除去されることが好ましい。本発明の脱細胞化組織は、移植治療で使用されることから、その組織または器官が処理（脱細胞化）の前に有していた機能を発揮するのに支障があるような損傷を受けていない。そのような支障があるかどうかは、その組織の細胞外マトリクスは実質的に変性を受けていないことを確認することにより判定することができる。上述のように力学的強度、耐圧特性などに優れ、また、レシピエントによる再細胞化（あるいは細胞置換）のための足場として好ましい。従来、組織の細胞残存率を下げる方法は存在した（Koide A., Hayashi T. eds (2000); "Basic and Clinical Studies of Extracellular Matrix (ECM); Aichi Shuppan Co. Ltd. Tokyo, Japan CAN: 133. 333569）が、従来の方法で細胞残存率を30%以下にすると、臓器移植に耐え得ないほどに損傷を受けざるを得なかった。従って、その組織または器官が処理（脱細胞化）前に有していた正常な機能を発揮するのに支障があるような損傷を受けずに、細胞残存率を顕著に下げるという格別の効果が本発明によって達成された。

#### 【0075】

上述のような有害作用を回避するために、ある実施形態において、本発明の脱細胞化組織の細胞残存率は、通常約50%以下であり、代表的には約40%以下であり、好ましくは約30%以下であり、より好ましくは約25%以下であり、さらに好ましくは約20%以下であり、なおさらに好ましくは約15%以下であり、もっと好ましくは約10%以下であり、最も好ましくは約5%以下であり得る。本発明の脱細胞化組織は、細胞残存率がこの程度に低くても、その組織損傷率が、臨床適用可能な程度に低いことが特徴である。細胞残存率が、いくら低くても、組織がもともと有していた（未処理状態での）機能を発揮していなければ臨床適用することができない。従って、上述の細胞残存率を保持し、かつその組織の組織損傷率が、より少ないほど好都合である。すなわち、その組織は、臨床適用可能な程度に低い組織損傷率を保持することが必要である。

#### 【0076】

臨床可能な程度に低い組織損傷率は、より少ないほど好都合であるが、通常約

50%以下であり、代表的には約40%以下であり、好ましくは約30%以下であり、より好ましくは約25%以下であり、さらに好ましくは約20%以下であり、なおさらに好ましくは約15%以下であり、もっと好ましくは約10%以下であり、最も好ましくは約5%以下であり得る。細胞残存率がこのように下がったとしても、組織または臓器がもともともっていた機能を発揮できない程度に損傷を受けたものは使用することができない。従って、本発明の目的を達成するために、本発明の組織は、その組織が有していた機能を発揮するのに支障があるような損傷を受けていないことが好ましい。組織がもともと有していた機能を発揮することができるかどうかは、組織損傷率によって評価することができる。組織損傷率の評価方法は、本明細書において上述した方法を用いて行うことができる。

#### 【0077】

従って、好ましい実施形態では、この脱細胞化組織では、1) その組織の細胞残存率は、約30%以下であり；かつ2) その組織の組織損傷率は、約30%以下である。より好ましい実施形態では、この脱細胞化組織では、1) その組織の細胞残存率は、約15%以下であり；かつ2) その組織の組織損傷率は、約15%以下である。さらに好ましい実施形態では、この脱細胞化組織では、1) その組織の細胞残存率は、約5%以下であり；かつ2) その組織の組織損傷率は、約15%以下である。これらの好ましい実施形態は、本発明の例示的实施形態であり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0078】

1つの実施形態において、本発明の脱細胞化組織は、臨床適用することができるような組織強度を有する。十分に強い組織強度は、特に、膜状の組織を臨床適用するとき重要な特性である。組織強度は一般に、引っ張り強さ（例えば、破断強度、剛性率、ヤング率など）を測定することによって判定することができる。ある実施形態において、本発明の脱細胞化組織は、処理前の組織が有していた組織強度の少なくとも約75%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上であり得、未処理状態での（もともと有していた）組織強度以上の値を有していてもよい。ここで、組織が未処理状

態での組織強度とは、その組織の処理（例えば、本発明の 1, 2-エポキシドポリマーでの処理）の前（例えば、天然での状態）で有していた組織強度をいう。十分に強い組織強度は、膜状以外の組織（例えば、管状組織）を適用する場合にも有することが好ましい特性である。管状組織の場合、組織強度は、 $\beta$  値で表すことができる。 $\beta$  値の算出方法は、本明細書の別の場所において詳述し、実施例においても例示した。ある実施形態において、本発明の脱細胞化組織は、約 15 以上の  $\beta$  値の組織強度を有し、好ましくは、約 18 以上の  $\beta$  値の組織強度を有し、より好ましくは約 20 以上の  $\beta$  値の組織強度を有し、さらに好ましくは約 22 以上の  $\beta$  値の組織強度を有する。別の実施形態において、本発明の脱細胞化組織は、処理前の組織が有していた  $\beta$  値の少なくとも約 75% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 85% 以上、さらに好ましくは約 90% 以上であり得、未処理状態での（もともと有していた） $\beta$  値以上の値を有していてもよい。ここで、組織が未処理状態での特性（例えば、 $\beta$  値）とは、その組織の処理（例えば、本発明の 1, 2-エポキシドポリマーでの処理）の前（例えば、天然での状態）で有していた特性をいう。従って、例えば、もともとの組織が 25 の  $\beta$  値を有していた場合は、好ましくは、本発明の脱細胞化組織は、17.5 以上、好ましくは 20 以上、より好ましくは 21.25 以上、さらに好ましくは 22.5 以上の  $\beta$  値を有し得る。

#### 【0079】

本発明の脱細胞化組織は、臨床適用が意図される組織であれば、身体のような組織であってもよい。ある実施形態では、本発明の脱細胞化組織は、組織の物理的構造が必要とされる組織であり得る。物理的構造を保持するためには、細胞の骨格などの構造のみが必要であり、細胞質成分などの細胞内の成分は必ずしも必要ないからである。また、必要に応じて、必要とされる細胞は、別途その脱細胞化組織に提供され得るか、または移植された宿主から内的に供給され得る。ある実施形態では、本発明の脱細胞化組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択される器官に由来する組織であり得る。別の実施形態では、本発明の脱細胞化組織は、心臓血管系の組織であり得、例えば、血管、血管様組織、心臓弁および心膜から選択される器官に由来し得る。

## 【0080】

本発明の脱細胞化組織は、意図される臨床適用に適合していれば、どのような生物由来の組織であってもよい。従って、本発明の組織は、どの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の組織でもあってもよい。ヒトへの適用が意図される場合、好ましくは、脊椎動物由来の組織が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の組織が用いられる。ヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、霊長類由来の組織が用いられる。ヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、ブタ由来の組織が用いられる。大きさがヒトに類似しているからである。ヒトへの適用が意図される場合、最も好ましくはヒト由来の組織が用いられる。本発明の脱細胞化組織または組織グラフトのサイズは、ヒト以外のものを使用する場合、ヒトのものに近いものであることが好ましく、その物理的特性がヒトのものに近いものであることが好ましい（例えば、ブタ）。

## 【0081】

別の局面において、本発明は、本発明の脱細胞化組織を含む組織グラフトを提供する。この組織グラフトにおいて、上記脱細胞化組織には、レシピエント由来の細胞が播種され、培養されて、所望の組織の構造が形成されていることが特徴である。本発明の組織グラフトは、臨床適用が意図される組織の組織グラフトであれば、身体のだどのような組織への移植を目的としてもよい。ある実施形態では、本発明の組織グラフトは、組織の物理的構造が必要とされる組織であり得る。物理的構造を保持するために、レシピエント由来の細胞が上述の脱細胞化組織に移植前に提供され得る。レシピエント由来の細胞は、宿主から内的に供給されていてもよい。ある実施形態では、本発明の組織グラフトは、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択される器官に由来する組織の組織グラフトであり得る。別の実施形態では、本発明の組織グラフトは、心臓血管系の組織の組織グラフトであり得、例えば、血管、血管様組織、心臓弁および心膜から選択される器官に由来する組織グラフトであり得る。

## 【0082】

本発明の組織グラフトは、意図される臨床適用に適合していれば、どのような

生物由来の組織を含んでいてもよい。従って、本発明の組織グラフトは、どの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の組織であってもよい。ヒトへの適用が意図される場合、好ましくは、脊椎動物由来の組織が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の組織が本発明の組織グラフトに用いられる。ヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、霊長類由来の組織が本発明の組織グラフトに用いられる。ヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、ブタ由来の組織が本発明の組織グラフトに用いられる。大きさがヒトに類似しているからである。ヒトへの適用が意図される場合、最も好ましくはヒト由来の組織が本発明の組織グラフトに用いられる。

#### 【0083】

本発明の組織グラフトに用いられるレシピエントの細胞は、臨床適用に適切であれば、どのような細胞であってもよい。従って、この細胞は、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、血球ならびにこれらに分化する前駆細胞および体性幹細胞からなる群より選択され得る。好ましくは、この細胞は、移植される部位において所望の機能を発揮することができる細胞であり得る。

#### 【0084】

別の局面において、本発明は膜状組織グラフトを提供する。この膜状組織グラフトは、1) 本発明の脱細胞化組織を含む。ここで、この脱細胞化組織には、レシピエント由来の細胞が播種され、培養されて、所望の組織の構造が形成されている。

#### 【0085】

他の局面において、本発明は、脱細胞化組織を生産する方法を提供する。この方法は、1) 組織を提供する工程；および2) この組織をミセル化しない両親媒性分子（例えば、1, 2-エポキシドポリマー）を含む溶液に浸す工程、を包含する。両親媒性分子は、ミセル化しないものであればどのようなものも用いることができ、細胞質成分を除去することができるものであれば、どのようなポリマーを用いることができる。好ましくは、本発明において用いられるミセル化しない両親媒性分子は、1, 2-エポキシドポリマーであり、より好ましくは、ポリエチレングリコール（PEG）である。1つの好ましい実施形態では、PEGの



平均分子量は、200と6000との間である。本発明において用いられるPEGは、このように種々の平均分子量を持ち得、平均分子量に応じて処理時間（浸す時間）を変更して所望の効果（例えば、脱細胞化）を達成することができる。

1つの好ましい実施形態では、本発明において用いられるPEGの平均分子量は、1000と2000との間である。別の好ましい実施形態では、本発明において用いられるPEGの平均分子量は、1500と2000との間である。別の実施形態では、本発明において用いられるPEGの平均分子量は、1000以下である。一般に、用いられるPEGの平均分子量が高くなるほど、処理時間は短いことが望ましい。用いられるPEGの平均分子量が高いほど、細胞内の成分を抽出する効果が高くなるからである。従って、1つの実施形態において、本発明の方法における、組織を1, 2-エポキシドポリマーを含む溶液に浸す工程は、30分間～60分間行われ得る。浸す工程において最低限必要な時間は、使用される1, 2-エポキシドポリマー（例えば、PEG）に応じて変動し、当業者に過度の実験を要することなく、決定することができる。従って、組織を1, 2-エポキシドポリマーを含む溶液に浸す工程は、30分より短い間行われてもよい。また、1, 2-エポキシドポリマーを含む溶液に浸す工程は、60分を超えて行われてもよい。最低限の時間は、参照実験において適宜処理時間を設定し、各々の時間点において処理された組織の状態を本明細書において記載される方法を用いて組織損傷率、細胞残存率などを計測することによって適切な特性を有するか否かを判定することによって、算出することができる。本発明の方法において、上記溶液の組織を浸す工程は、どのような条件で行われてもよいが、通常0℃と42℃との間で行われ得、室温（約15℃と約25℃との間）で行われてもよく、37℃で行われてもよい。この工程は、37℃を超える温度で行われてもよい。本発明の方法において、1, 2-エポキシドポリマー（例えば、PEG）は、溶液中にどのような濃度で存在してもよいが、好ましくは、1g/ml以上の濃度で存在する。ただし、原料試薬としてPEG（分子量1000）を使用する場合、常温で固体であることから、水溶液とすることが好ましくあり得る。本発明の方法において、1, 2-エポキシドポリマー（例えば、PEG）は、どのような溶媒に溶解していてもよいが、好ましくは、水性媒体に溶解され、より好

ましくは、生理食塩水、PBS、または他の塩類などが含有される水溶液などに溶解され得る。このような溶液は、本発明において使用されるミセル化しない両親媒性分子が、その溶液において通常使用される濃度でミセル化しないのであればどのようなものでも使用することができる。ミセル化しない両親媒性分子（例えば、1, 2-エポキシドポリマー）の溶液は、滅菌されていることが好ましい。本発明において用いられるミセル化しない両親媒性分子（例えば、1, 2-エポキシドポリマー）は、生体適合性であることが好ましい。そのような生体適合性のミセル化しない両親媒性分子（例えば、1, 2-エポキシドポリマー）としては、生体適合性を有すると同時に医薬品グレードに用いることが可能なポリマーが挙げられ、例えば、PEG、セグメント化ポリウレタン、シリコン、MMA（ $\alpha$ メチルメタクリレート（コンタクトレンズ材）など）、PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）（例えば、テフロン（登録商標）またはDacronなど）が挙げられるがそれらに限定されない。そのような生体適合性1, 2-エポキシドポリマーは、例えば、日本薬局方（あるいは、対応する他の国における薬局方）に掲載されているか、または厚生労働省（あるいは、対応する他の国における監督官庁）が認可したポリマーであり得る。

#### 【0086】

好ましくは、本発明の方法では、上述の1, 2-エポキシドポリマーを含む溶液へ浸す工程は、DNase（例えば、DNase I）への処理とともに行われ得るか、またはDNase（例えば、DNase I）の処理が引き続いて行われ得る。

#### 【0087】

好ましくは、本発明の方法は、溶液に浸された組織を洗浄する工程、をさらに包含する。この洗浄工程は、生理的に適合する液体（例えば、生理食塩水、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）など）であれば、どのような液体を用いても行うことができる。好ましい実施形態では、本発明の上記洗浄は、PBSで行われる。洗浄溶液は、滅菌されていることが好ましい。洗浄は、どのような条件で行われてもよいが、通常0℃と42℃との間で行われ得、室温（約15℃と約25℃との間）で行われてもよく、37℃で行われてもよい。洗浄は、37℃を超える

温度で行われてもよい。本発明の方法において、洗浄する工程は、1, 2-エポキシドポリマー溶液が十分に除去されれば、どのような期間で行われてもよいが、通常3日間～5日間行われ得る。好ましくは、洗浄する工程において、洗浄溶液（例えば、PBS）は、数回交換されてもよい。

#### 【0088】

本発明の方法において使用される組織は、意図される臨床適用に適合していれば、どのような生物由来の組織であってもよい。従って、本発明の方法において用いられる組織は、どの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の組織でもあってもよい。ヒトへの適用が意図される場合、本発明の方法において用いられる組織としては、好ましくは、脊椎動物由来の組織が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の組織が用いられる。ヒトへの適用が意図される場合、本発明の方法において用いられる組織としては、さらに好ましくは、霊長類由来の組織が用いられる。ヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、ブタ由来の組織が用いられる。大きさがヒトに類似しているからである。ヒトへの適用が意図される場合、最も好ましくはヒト由来の組織が用いられる。

#### 【0089】

本発明の方法において用いられる組織は、臨床適用が意図される組織であれば、身体のような組織であってもよい。ある実施形態では、本発明の方法において用いられる組織は、組織の物理的構造または物性が必要とされる組織であり得る。物理的構造または物性を保持するためには、細胞外マトリクスなどの構造のみが必要であり、細胞質成分または細胞膜成分などの細胞内の成分は必ずしも必要ないからである。また、必要に応じて、必要とされる細胞は、別途その脱細胞化組織に提供され得るか、または移植された宿主から内的に供給され得る。ある実施形態では、本発明の方法において用いられる組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択される器官に由来する組織であり得る。別の実施形態では、本発明の方法において用いられる組織は、心臓血管系の組織であり得、例えば、血管、血管様組織、心臓弁および心膜から選択される器官に由来し得る。

## 【0090】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、化学的処理を行う工程、をさらに包含し得る。ここで、この化学的処理は、本発明の方法における本発明のミセル化しない両親媒性分子（例えば、ポリエチレングリコールのような1, 2-エポキシドポリマー）を含む溶液に浸す工程以外の他の工程であり得る。あるいは、この化学的処理は、本発明の方法における本発明のミセル化しない両親媒性分子（例えば、ポリエチレングリコールのような1, 2-エポキシドポリマー）を含む溶液に浸す工程と同じ（すなわち、反復すること）であってもよい。従って、本発明の方法において、例えば、平均分子量が1000-2000のポリエチレングリコール含有溶液に浸す工程の他に化学的処理が施される場合、化学的処理は、平均分子量が1000-2000のポリエチレングリコール含有溶液以外の溶液（例えば、DNase（例えば、DNase I）溶液、グルタルアルデヒド溶液、他の平均分子量を有するポリエチレングリコール溶液、他の本発明のミセル化しない両親媒性分子（例えば、1, 2-エポキシドポリマー）溶液などを含むがそれらに限定されない）に浸す工程を包含する。あるいは、例えば、平均分子量が1000-2000のポリエチレングリコール含有溶液に浸す工程の他に化学的処理が施される場合、化学的処理は、平均分子量が1000-2000のポリエチレングリコール含有溶液の溶液に浸す工程を反復する工程を包含し得る。

## 【0091】

1つの実施形態において、上述の化学的処理は、二官能性分子架橋剤（例えば、グルタルアルデヒドまたはその誘導体）による処理であり得る。二官能性分子架橋剤による処理は、ECMもしくは組織中の細胞を含むタンパク質成分などを化学的に架橋することにより物理的強度を増加させることを目的とする。従って、この目的に使用するのであれば、二官能性分子架橋剤である限りどのようなものでも使用することができる。そのような二官能性分子架橋剤のなかで実際に組織の固定（弁グラフト）に使用されているものは、例えば、シアンイミド（cyanimide）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）、エポキシ（ポリ（グリシジルエーテル））

または光架橋剤 PhotoMix™ (Sulzer Carbomedics Co. Ltd.) が挙げられるがそれらに限定されない (参考として、Biomaterials (2000) 21:2215-2231 を参照のこと)。別の実施形態において、この化学的処理は、DNase I のような DNase での処理を包含し得る。そのような DNase での処理により、移植に好ましくない DNA 成分をさらに除去することができることから、この DNase での処理は、好ましい。そのような DNase はどのような DNase でもよいが、好ましくは DNase I であり得る。DNase 処理により荷電性高分子物質である DNA を除去することができる。DNA は免疫反応を誘起する可能性があることから、DNA をさらに除去することはさらなる利点を提供することができる。

#### 【0092】

本発明はまた、本発明の脱細胞化方法によって得られる脱細胞化組織を提供する。この脱細胞化組織は、好ましくは、上述の細胞残存率および／または組織損傷率および／または組織強度を有し得る。本発明の脱細胞化方法が提供される前は、上述の細胞残存率および／または組織損傷率および／または組織強度を有する脱細胞化組織を提供することはできなかったことから、本発明の脱細胞化方法は、従来の方法では提供することができなかった特性を有する脱細胞化組織を提供するという予想外の利点を提供する。

#### 【0093】

別の局面において、本発明は、組織の再生方法を提供する。この方法は、1) 本発明の脱細胞化組織を提供する工程；2) この脱細胞化組織に細胞を提供する工程；3) この細胞の分化を誘導する生理活性物質を提供する工程；および4) この細胞の分化が生じるに十分な時間インキュベートする工程、を包含する。好ましくは、この細胞は、血管細胞または血管様細胞であり得る。より好ましくは、この細胞は、レシピエント由来であり得る。好ましくは、この組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織であり得る。好ましい実施形態では、この組織とこの細胞とは、同じ宿主由来であり得る。別の実施形態では、この組織とこの細胞とは、同種異系宿主由来であり得る。別の実施形態では、この組織とこの細胞とは、異種宿主由来であ

り得る。レシピエントと細胞とが同種異系由来または異種由来である場合、拒絶反応が考えられることから、レシピエントと細胞とは同じ宿主由来であることが好ましいが、拒絶反応が問題でない場合同種異系由来または異種由来であってもよい。また、拒絶反応を起こすものも必要に応じて拒絶反応を解消する処置を行うことにより利用することができる。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学体系、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて（改訂第3版）に記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、「シクロスポリン」（サンディミュン／ネオーラル）、「タクロリムス」（プロGRAF）、「アザチオプリン」（イムラン）、「ステロイドホルモン」（プレドニン、メチルプレドニン）、「T細胞抗体」（OKT3、ATGなど）があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリンおよびステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本発明の医薬と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は再生方法を行う前または後にも投与され得る。

#### 【0094】

別の局面では、本発明は、組織グラフトを生産する方法を提供する。この方法は、1) 本発明の脱細胞化組織を生体内に提供する工程；2) この脱細胞化組織にその生体の自己細胞を侵入させる工程；および3) その自己細胞の分化が生じるに十分な時間インキュベートする工程、を包含する。好ましくは、この細胞は、血管細胞または血管様細胞であり得る。より好ましくは、この細胞は、レシピエント由来であり得る。好ましくは、この組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織であり得る。好ましい実施形態では、この組織とこの細胞とは、同じ宿主由来であり得る。別の実施形態では、この組織とこの細胞とは、同種異系宿主由来であり得る。別の実施形態では、この組織とこの細胞とは、異種宿主由来であり得る。レシピエントと細胞とが同種異系由来または異種由来である場合、拒絶反応が考えられることから、レシピエントと細胞とは同じ宿主由来であることが好ましいが、拒絶反応

が問題でない場合同種異系由来または異種由来であってもよい。また、拒絶反応を起こすものも必要に応じて拒絶反応を解消する処置を行うことにより利用することができる。拒絶反応を解消する処置は、本明細書において詳述されている。

#### 【0095】

好ましい実施形態において、本発明の組織グラフトを生産する方法は、4) 上記細胞の分化を誘導する生理活性物質を提供する工程、をさらに包含し得る。好ましくは、この生理活性物質は、造血活性を有するサイトカインであり得る。組織グラフトを製造する場合、このサイトカインは、HGF、VEGF、FGFなどであり得る。

#### 【0096】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって生産された、組織グラフトを提供する。

#### 【0097】

他の局面において、本発明は、組織または臓器移植を必要とするかまたはその危険にある被験体の処置または予防の方法を提供する。この方法は、1) 本発明の脱細胞化組織または組織グラフトを提供する工程；および2) その脱細胞化組織を被験体に移植する工程、を包含する。好ましくは、この組織は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨からなる群より選択されるものの組織であり得る。好ましい実施形態では、この組織は、被験体由来であり得る。別の実施形態では、この組織は、被験体と同種異系の宿主由来であり得る。別の実施形態では、この組織は、被験体とは異種の宿主由来であり得る。本発明のこの治療／予防方法では、移植に耐え得る程度の組織損傷率に抑えられ、かつ、脱細胞化が十分に行われた脱細胞化組織が使用されることから、拒絶反応は生じない。ただし、かりに拒絶反応が生じた場合、またはレシピエント由来以外の細胞が用いられた場合、拒絶反応を起こしたときに、必要に応じて拒絶反応を解消する処置を行うことができる。拒絶反応を解消する処置は、本明細書において詳述されている。1つの実施形態では、本発明の処置または予防する方法において使用される組織は、被験体由来であってもよい。別の実施形態では、本発明の処置または予防する方法において使用される組織は、どの生物（例えば、脊椎動物、無

脊椎動物) 由来の組織でもよい。好ましくは、ヒトが処置または予防される場合、脊椎動物由来の組織が用いられ、ヒトが処置または予防される場合、より好ましくは、哺乳動物 (例えば、霊長類、齧歯類など) 由来の組織が用いられる。ヒトが処置または予防される場合、さらに好ましくは、霊長類由来の組織が用いられる。ヒトが処置または予防される場合、別の好ましい実施形態では、ブタ由来の組織が用いられる。ブタが好ましいのは、ヒトに類似した大きさを有するからである。ヒトが処置または予防される場合、最も好ましくはヒト由来の組織が用いられ得る。

#### 【0098】

別の局面において、本発明は、臓器移植のための医薬を提供する。この医薬は、本発明の脱細胞化組織または本発明の組織グラフトを含む。ある実施形態では、本発明の医薬は、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択される器官に由来する組織を含む。別の実施形態では、本発明の医薬は、心臓血管系の組織を含み得、例えば、血管、血管様組織、心臓弁および心膜から選択される器官に由来するものを含み得る。

#### 【0099】

本発明の医薬は、意図される臨床適用に適合していれば、どのような生物由来の組織を含んでいてもよい。好ましくは、適用される国の監督官庁が認可した材料を含み得る。従って、本発明の医薬は、どの生物 (例えば、脊椎動物、無脊椎動物) 由来の組織を含んでいてもよい。本発明の医薬においてヒトへの適用が意図される場合、好ましくは、脊椎動物由来の組織が用いられ、より好ましくは、哺乳動物 (例えば、霊長類、齧歯類など) 由来の組織が用いられる。本発明の医薬においてヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、霊長類由来の組織が用いられる。本発明の医薬においてヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、ブタ由来の組織が用いられる。大きさがヒトに類似しているからである。本発明の医薬においてヒトへの適用が意図される場合、最も好ましくはヒト由来の組織が用いられる。ただし、ヒト由来の組織を使用する場合は、倫理規定・問題をクリアしていることが必要とされ得る。

#### 【0100】



本発明の医薬、組織グラフトおよび脱細胞化組織はまた、さらに生体親和性材料を含み得る。この生体親和性材料は、例えば、シリコーン、コラーゲン、ゼラチン、グリコール酸・乳酸の共重合体、エチレンビニル酢酸共重合体、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリレート、ポリメタクリレートからなる群より選択される少なくとも1つを含み得る。成型が容易であることからシリコーンが好ましい。生分解性高分子の例としては、コラーゲン、ゼラチン、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類（例えば、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸など）、ヒドロキシジカルボン酸類（例えば、リンゴ酸など）およびヒドロキシトリカルボン酸（例えば、クエン酸など）からなる群より選択される1種以上から無触媒脱水重縮合により合成された重合体、共重合体またはこれらの混合物、ポリ- $\alpha$ -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸（例えば、ポリ- $\gamma$ -ベンジル-L-グルタミン酸など）、無水マレイン酸系共重合体（例えば、スチレン-マレイン酸共重合体など）のポリ酸無水物などが挙げられる。重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよく、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-体、L-体、DL-体のいずれでも用いることが可能である。ある実施形態では、グリコール酸・乳酸の共重合体が使用され得る。

#### 【0101】

本発明の医薬、組織グラフトおよび脱細胞化組織は、さらに他の薬剤を含み得る。そのような薬剤は、薬学分野において公知の任意の薬剤であり得る。当然、本発明の医薬、組織グラフトおよび脱細胞化組織は、2種類以上の他の薬剤を含んでいてもよい。そのような薬剤としては、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などの最新版において掲載されているものなどが挙げられる。そのような薬剤は、好ましくは、生物の器官に対して効果を有するものであり得る。そのような薬剤としては、例えば、血栓溶解剤、血管拡張剤、組織賦活化剤が挙げられる。本発明の医薬、組織グラフトおよび脱細胞化組織において含まれる生理活性物質、他の薬剤および細胞などの量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴などを考慮して、当業者が容易に

決定することができる。

#### 【0102】

別の局面において、本発明は、臓器移植のための医薬を製造するための、本発明の脱細胞化組織または本発明の組織グラフトの、使用に関する。ある実施形態では、本発明の使用において、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨から選択される器官に由来する組織が使用され得る。別の実施形態では、本発明の使用において、心臓血管系の組織が使用され得、例えば、血管、血管様組織、心臓弁および心膜から選択される器官に由来するものを使用され得る。

#### 【0103】

本発明の使用において、意図される臨床適用に適合していれば、どのような生物由来の組織でも使用することができる。好ましくは、適用される国の監督官庁が認可した材料が使用され得る。従って、本発明の使用において、どの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の組織が使用されてもよい。本発明の使用においてヒトへの適用が意図される場合、好ましくは、脊椎動物由来の組織が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の組織が用いられる。本発明の使用においてヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、霊長類由来の組織が用いられる。本発明の医薬においてヒトへの適用が意図される場合、さらに好ましくは、ブタ由来の組織が用いられる。大きさがヒトに類似しているからである。本発明の使用においてヒトへの適用が意図される場合、最も好ましくはヒト由来の組織が用いられる。ただし、ヒト由来の組織を使用する場合は、倫理規定・問題をクリアしていることが必要とされ得る。

#### 【0104】

本発明の脱細胞化組織、グラフトおよび医薬の使用は、通常は医師の監督のもとで行われるが、その国の監督官庁および法律が許容する場合は、医師の監督なしに使用することができる。

#### 【0105】

本発明の処置または予防方法において使用される脱細胞化組織、グラフトおよび医薬の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、被験体の年齢、体重、性別、既往歴、生理活性物質の形態または種類、組織の形態または種類などを

考慮して、当業者が容易に決定することができる。

【0106】

本発明の方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、1回あたりの脱細胞化組織、グラフトおよび医薬の使用量、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間－1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

【0107】

本明細書では、必要に応じて当該分野で周知の分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法が用いられる。そのような方法は、例えば、Ausubel F. A. ら編（1988）、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY；Sambrook J ら（1987）Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。

【0108】

別の局面において、本発明の脱細胞化組織、グラフトおよび／または医薬は、この脱細胞化組織、グラフトおよび／または医薬を投与する指針を与える指示書を備える。ここで、上記指示書は、脱細胞化組織、グラフトおよび／または医薬の適切な投与方法を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

## 【0109】

本発明の脱細胞化組織、組織グラフトおよび医薬は、当該分野において周知の技術を用いて移植することができる（外科手術に関しては、標準外科学第9版（医学書院）基本的外科手術手技（p41-p66）、心臓（p349-p398）、血管（p399-428）などを参照のこと）。本発明の脱細胞化組織は、血管吻合、パッチ閉鎖術、人工血管置換術、人工弁置換術などに使用され得る。したがって、当業者は、処置する状況に応じて、本明細書の開示に従って、本発明の脱細胞化組織、組織グラフトおよび医薬を、適宜適用することができる。

## 【0110】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

## 【0111】

## 【実施例】

## （実施例1）

## （材料および方法）

## （PEGによる脱細胞化）

ブタ頸動脈をHybrid（混合種）（Labo Products Co. Ltd., Osaka, Japan）から、およびラット大動脈をSDラット（雄性、5週齢、日本動物、Tokyo, Japan）から、滅菌条件下で調製した。動物使用の倫理に関しては、大阪大学の動物実験の倫理に関する規定に従って行った。

## 【0112】

新鮮に収集したブタ頸動脈およびラット大動脈を、抗生物質（Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA）を含むPBS（これを本実施例においてPBS（-）とする。Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA）に入れ、血液成分を洗浄除去した。次いで、血管を、ポリエチレングリコール（1g/ml、ナカライテスク（Nacalai Tesq

ue Inc)、京都、日本) (平均分子量1000) を含む脱細胞化水溶液に入れ、0.5時間放置した。溶液の粘性が高いため、血管に穏やかに何回か、室温でガラス棒で圧力をかけた。室温で、ローター機器 (Tube rotator TR-118: Iuchi Co. Ltd、大阪、日本) において、抗生物質 (100ユニットのペニシリン、0.1mgのストレプトマイシン、0.25  $\mu$ g/mlのアムホテリシンB; すべてGibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA) を含むPBS (-) に血管を入れた。洗浄溶液を、72時間にわたり24時間おきに交換した。リンスした後、血管を、DNase I (寶酒造、滋賀、日本) を含むPBS (+) (PBS (-) に5mM  $MgCl_2$  を添加したもの) に37℃で1時間浸した。血管を、室温でローター機器に配置した上述の抗生物質を含むPBS (-) に入れた。洗浄溶液を、72時間にわたり24時間おきに交換した。リンスした後、血管を、4℃で抗生物質を含むPBS (-) 中で保存した。

#### 【0113】

平均分子量1000のPEGに加え、平均分子量2000、200および6000のPEGを用いて、上述と同様の方法で脱細胞化処理を行った。脱細胞化処理には、どの分子量のものも使用することができた。脱細胞化処理には平均分子量が2000および6000のものがよりよい結果を与えるようであったが、脱細胞化処理の取り扱いが平均分子量1000のものがより容易であった。

#### 【0114】

次に、従来の脱細胞化プロセスに基づいて脱細胞化組織を調製した (従来型 (1) = 第一世代、(2) = 第二世代)。その手順を以下に示す。

#### 【0115】

(第一世代従来型脱細胞化プロセス)

- 1) (洗浄) 組織を、生理食塩水で、1時間4℃にて洗浄した。

#### 【0116】

- 2) (第一回界面活性剤処理) 組織を、生理食塩水中1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、Sodium Laurel Sulfate, SIGMA L-4509) 中に入れ、室温で48時間放置した。

## 【0117】

3) (洗浄) 組織を取り出し、再び生理食塩水中に入れ24時間室温で放置した。

## 【0118】

4) (第二回界面活性剤処理) 組織を、生理食塩水中1%NP-40 (SIGMA I-3021) 中に入れ、室温で48時間放置した。

## 【0119】

5) (洗浄) 組織を取り出し、再び生理食塩水中に入れ24時間室温で放置した。

## 【0120】

6) (滅菌) 20%イソプロパノール (SIGMA I-0398) 中に組織を入れ、使用または実験時まで滅菌保存した。

## 【0121】

(第二世代従来型脱細胞化プロセス)

1) (洗浄) 組織を、プロテアーゼ阻害剤 (PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL; SIGMA P2714) および20mM EDTAを含む生理食塩水に入れ、24時間37℃にて洗浄した。

## 【0122】

2) (第一回界面活性剤処理) 組織を、生理食塩水中1%SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、Sodium Laurel Sulfate, SIGMA L-4509) 中に入れ、室温で72時間放置した。

## 【0123】

3) (洗浄) 組織を取り出し、生理食塩水中に入れ48時間以上37℃で放置した。

## 【0124】

4) (第二回界面活性剤処理) 組織を、生理食塩水中1%NP-40 (SIGMA I-3021) 中に入れ、室温で48時間以上放置した。

## 【0125】

5) (洗浄) 組織を取り出し、再び生理食塩水中に入れ48時間37℃で放置

した。

【0126】

- 6) (低温化学プロセス) 定法に従い低温化学プロセスをおこなった。

【0127】

- 7) (滅菌) 0.05% アジ化ナトリウム中に組織を入れ、使用または実験時まで滅菌保存した。

【0128】

これらの方法は、従来のものに準じている。

【0129】

(Triton 処理)

- 1) (洗浄) 組織を、生理食塩水で、1時間4℃にて洗浄した。

【0130】

- 2) (界面活性剤処理) 組織を、生理食塩水中1% Triton (登録商標) X-100 (ICN Biomedicals, Inc. CA, USA) + 0.1% 水酸化アンモニウム (ammonium hydroxide) (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 大阪、日本) の脱細胞処理液中に組織 (例えば、血管) を浸し、4℃にてシェーカーにて、24時間ごとに処理液を交換して処理した。

- 3) (洗浄) その後、4℃にてシェーカーにて24時間ごとに3回PBSを交換することによって洗浄した。

【0131】

このように、従来界面活性剤による組織の処理において、SDSおよびTritonが望ましい物理的特性を得るために好ましいことが知られているが、SDSおよびTritonのような界面活性剤は、臨床適用には向かないことが知られており、従って、これら従来型の処理は、あくまで研究室レベルでの参照として用いた。界面活性剤は、ミセル化してタンパク質、脂質などの物質を除去するが、PEGはミセル化しない両親媒性の分子であり、したがってミセル化しない両親媒性溶液として細胞成分の抽出に準じた細胞成分の除去を行っている。このように、本実施例においてミセル化しない両親媒性溶液が界面活性剤のようなミ

セル化する溶液よりもはるかに優れた脱細胞化処理を行うことが明らかになった。このことから、本発明の脱細胞化処理には他のミセル化しない両親媒性分子も使用することができると考えられる。

#### 【0132】

これらの界面活性剤を用いてブタ大動脈弁組織の細胞外マトリクスから細胞および細胞碎片 (d e b r i s) の除去を行うことができた。ここで使用した界面活性剤は、とりわけ、細胞形質膜および細胞内オルガネラのリン脂質の可溶化が目的であった。両親媒性膜タンパク質もまた界面活性剤で溶出することができた。37℃まで処理温度を上げると、可溶化が促進され、マトリクスからの物質の拡散が促進された。

#### 【0133】

コラーゲン構造には、pH、イオン強度、溶剤の極性、陰イオン界面活性剤などが影響を与え得ることが示されている (Ripamonti A, et al., 1980, Biopolymers 19:965-975; および Xiao WH, Knight DP, Chapman JA., 1997, Biochimica et Biophysica Acta. 1134:327-337)。コラーゲン構造が変化すると生体工学的特性が変化することも知られている。このような問題を回避するために、この実施例では、脱細胞化プロセスを、マトリクスに影響がないように設計した。コラーゲン構造の組織学的試験および張力強度測定によりマトリクスが全く損なわれていないことを以下の実験で実証した。

#### 【0134】

##### (組織学的検査)

血管移植片のパラフィン切片 (厚さ 3  $\mu$ m) を調製し、そしてヘマトキシリン-エオシン染色を行って、細胞外マトリクスの同定を行った。基底膜の成分である I / IV 型コラーゲンを同定するために、免疫組織化学的染色法を用いた。SD ラット (雄性、5 週齢、Nippon Animal Co. Ltd. 東京、日本) の大動脈を 4 % パラホルムアルデヒドで固定し、凍結保護した。凍結切片 (5  $\mu$ m 厚) を調製し、PBS (-) で 3 時間透過性にし、そして PBS (-)



中の1%BSAで1時間室温でブロッキングした。ついで、この切片を一次抗体（抗ラットコラーゲン抗体、コスモバイオ、東京、日本）とともにインキュベートし、そしてFITCと結合体化した二次抗体（抗ヒツジIg抗体；コスモバイオ、東京、日本）とインキュベートした。画像は、Zeiss LSM510共焦点顕微鏡を用いて得た。

#### 【0135】

この結果を、図1～4に示す。図1は、本発明のPEG処理、PEGおよびDNase処理、処理なしのヘマトキシリン&エオシン（H&E）染色の結果を示す。図2は、SDS処理（第一世代および第二世代）との比較のための処理なしのブタ大動脈の写真である。図3および図4は、第一世代のSDS処理後の様子を示した写真である。

#### 【0136】

（内皮細胞（EC）標識）

ラット内皮細胞（EC）の調製は、以前に記載されるように行った（Fenselan A., Mello RJ, Cancer Res. 1976, 36, 3269-3273）。簡潔に説明すると、5週齢のSDラット（180-200g）を二酸化炭素吸入により殺傷し、大動脈を取り出した。大動脈を、PBS（-）中の3mg/mlコラーゲナーゼに、37℃で30分間に浸した。生じた懸濁液を900×gで4分間遠心分離し、次いで細胞を10mlのDMEM+10%ウシ胎仔血清中に再懸濁した。細胞を、 $4 \times 10^5$ 細胞/mlに入れ、37℃で5%CO<sub>2</sub>中でインキュベートした。

#### 【0137】

（初代培養）

ラット内皮細胞（EC）を、10%のウシ胎仔血清（FBS）（Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA）、1%非必須アミノ酸（Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA）および抗生物質（100ユニット ペニシリン、0.1mgストレプトマイシン、0.25μg/ml アムホテリシンB；Gibco BRL, Life Techno

logies Inc. Rockville, MD, USA) を含むDMEM (Earle塩 (+) L-グルタミンを補充した最小必須培地、Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD, USA) で37℃にて5%CO<sub>2</sub>雰囲気でFalcon組織培養ディッシュ (Falcon 3003, Beckton-Dickinson Co. Ltd., New Jersey, USA) 中で維持した。標識するために、細胞を3回リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で2回洗浄し、そして12mlの培地を加えた。ECを5  $\mu$ g/mlの細胞追跡用蛍光色素であるDiI (Molecular Probes, Inc, Eugene OR USA) で37℃で30分間標識し、3回PBS (-) で洗浄した。このように標識したECをすぐに以下のアッセイに用いた。

#### 【0138】

(脱細胞化移植片へのEC播種)

脱細胞化血管移植片を、ナイロン糸の両側に結合させた。細胞懸濁物を、26ゲージの針を装着した10mlの使い捨てシリンジを用いて血管に流し込んでECを導入した。脱細胞化移植片を、室温で1時間回転させながら $1.0 \times 10^7$ 細胞/mlの密度で播種した。この組織培養物を、37℃で95%空気および5%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気中で維持した。これらの組織を、上述の10%FBSおよび抗生物質を補充したDMEMで培養した。

#### 【0139】

(P-D関係)

圧力-直径 (P-D) 関係の測定を、Hiromichi SonodaおよびKeiichi Takamizawa (Hiromichi Sonoda et al., J Biomed Mater Res 2001; 55: 266-276) の方法に従って実施した。動脈切片の一端を固定されたステンレス鋼コネクタにカニューレ接続し、他端をスライディングコネクタにカニューレ接続した。血管切片を加圧腔内Krebs-Ringer溶液で徐々に膨潤させた。血管の中部で血管の外径をテレビシステム (C1000-16; Hamamatsu Photonics) および幅分析器 (HTV-C1170; Ha

mamatsu Photonics) を用いてモニターした。腔内圧力を、圧カトランス (6M92; NECSanei, Tokyo, Japan) を用いて同時に記録した。

#### 【0140】

(結果)

図1 (c) および (d) に示されるように、天然の組織の細胞質成分は、1 g / ml PEG (平均分子量1000) の水溶液により取り除かれていた。細胞膜の流動性は、高密度のPEG水溶液により顕著に改善された。図1 (c) および (d) において示されるように、細胞膜およびDNA成分以外の細胞質成分の除去が観察された。DNA成分の沈降が確認されたからである。これらの成分が凝集することは、PEG水溶液がDNAにアクセス可能であることによって説明される。このことは、細胞膜および細胞質ゾルの抽出が容易となる要因である。組織移植片において生じる恒常的なDNA成分の分解物および溶解物は、DNase I によって容易に除去され得る。このことは、HE染色画像によって、図1 (e) および (g) において示されるように明らかに観察される。細胞成分が除去されたことに起因して、空洞形成が、弾力性プレートの間に観察された。この空洞形成が細胞外マトリクスの分解を抑えるようである。特に、この処理は、コラーゲン成分に対する効果が見かけ上低い。

#### 【0141】

共焦点レーザ走査顕微鏡によって観察されるように (図5 (a) および (b) )、PEG / DNase I 処理により、I型コラーゲンのわずかな減少が確認された。図5 (c) および (d) に示されるように、血管の基底膜成分であるIV型コラーゲンの残留が観察された。特に、血管内皮細胞は、抗血栓活性の目的で容易に播種することができた。

#### 【0142】

細胞成分の除去による機械的特性の減少が想定されるものの、動脈血管の伸展特性は維持されていた (図6) 。腔内圧が上昇すると、動脈は圧力依存様式で膨張した。処理していない動脈およびPEG / DNase I で処理した動脈の場合、約30 mmHgまでの低圧領域において、外径は、同様に有意に増加した。し

かし、生理的圧力の範囲内では、圧力依存性の増加は小さくなった。これらのP-D関係の特徴は、細胞外マトリクスの分解が抑制されたことを示す。

### 【0143】

#### (細胞残存率)

細胞残存率を、 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ の面積中にある核数を顕微鏡を使用して計数することによって算出した。具体的には、処理前に同じサンプル中の上記面積中にある核数を顕微鏡を使用して計数し、処理後にも同様に計数し、処理後のサンプル中の核数を処理前の核数で除し100倍することにより、細胞残存率(%)を算出した。結果を以下の表1に示す。

### 【0144】

#### (組織損傷率)

組織損傷率は、一視野を $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ ごとのユニットに区切り、ユニットを単位としてエラスチン断裂部位がある場合にカウントして算出した。一視野あたり24ユニットが存在した。エラスチン断裂は、 $x/24$ で表した。 $x$ は、ユニット中に断列がある場合に計数氏、例えば、全く断列が確認できない場合(未処理のコントロールなど)、 $0/24$ として算出して0%とした。結果を以下の表1にまとめる。

### 【0145】

【表1】

【表1】

	細胞残存率	組織損傷率
処理なし	100%	0%
第一世代SDSプロセス	38.8%	40%
第二世代SDSプロセス	14.6%	15%
PEG/DNaseI処理	4.7%	15%
TRITON処理	17.8%	34%

#### (細胞強度)

細胞強度は、 $\beta$  値として表した。上述のP-D関係の曲線を作成した後、以下の方程式によって $\beta$  値を算出した。

【0146】

$$\ln(P/P_s) = \beta(D/D_s - 1) \quad (1)$$

ここで、Pは測定された圧力であり、 $P_s$ は標準圧力（ここでは、100 mm Hgである）であり、Dは測定された直径であり、 $D_s$ は100 mm Hgの圧力で測定された直径を示す。 $\beta$  値は、増加すればするほど、剛性が高いことを示す。このようにして得た $\beta$  値の結果を以下の表2に示す。SDS処理した脱細胞化組織もTriton（登録商標）と同様の $\beta$  値を有していた（データ示さず）。

【0147】

【表2】

【表2】

処理	$D_s$	$\beta$ 値
処理なし(ブタ大動脈)	3.44	25.3
PEG/DNaseI処理	4.74	22.0
Triton(登録商標)X100処理	5.32	17.5

(破断加重)

次に、破断加重を調べた。破断加重は、脱細胞化処理ブタ大動脈弁の大動脈壁部分を幅5 mm、長さ30 mmの短冊状にし、引張試験機(TENSION RTC1150A: エーアンドディー社)で試験速度5 mm/minで引張り、最大破断点加重を測定した(Shinoka T, Mayer JE. Tissue engineering heart valve leaflets. Circulation. 1997;96(suppl II):II-102-II-107; Shum-Tim D, Mayer JE. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. Ann Thorac Surg. 1999;68:2298-2304)。その結果、生

体組織では  $1.6 \pm 0.9 \text{ kgf}$  であるのに対して、PEG 処理では、 $1.7 \pm 0.6 \text{ kgf}$  であった。また、界面活性剤処理のものは、これらの値より著しく減少していた。従って、破断加重というパラメータからみても、本発明による PEG 処理では物理的特性が損傷されていないことが実証された。

#### 【0148】

##### (考察)

ポリエチレングリコールは、典型的な両親媒性および高い生体適合性を有するポリマーである。ポリエチレングリコールは、その特徴的な分子特性によって種々の有用性があることが知られている。例えば、ポリエチレングリコール溶液は、生物学的実験において DNA の精製に使用される。別の例では、ポリエチレングリコールは、臨床等級のペプチド結合体を使用される (Veronese FM, Biomaterials, 2001, 22:405-417; Monfardini C., Veronese FM, Bioconjugate Chem. 1998, 9:418-450 など) を参照のこと)。ポリエチレングリコールは、ハイブリドーマ製造において細胞融合のために使用されているが、高密度の PEG 水溶液によって組織の細胞質成分を含む細胞膜が顕著に流動化され、除去されるという本発明者らの結果は予想外であった。脱細胞化異種移植片および同種異系移植片の組織を、界面活性剤 (例えば、Tris (登録商標)、SDS など) を用いる方法によって生産することが可能である。これら界面活性剤は、医療用途への適用が限定または禁止されていることから、用いないことが好ましい。しかし、これらの移植片の臨床適用において、異種移植片および同種異系移植片の組織の生産は、毒性の界面活性剤を使わず、かつ、グルタルアルデヒドによる固定も使わずに行われることが望ましいと考えられる。本発明の方法の利点のひとつは、毒性の界面活性剤を用いることなく、より効率のよい脱細胞化が行われることである。

#### 【0149】

天然の動脈の P (圧力) - D (直径) の関係では、低圧領域において伸展特性の顕著な増加を示し、そして高圧領域においてほとんど伸展特性が見られなかった。この P - D 関係は、「J」曲線と呼ばれる。伸展特性 (compliance

e) の効果は、細い直径の人工移植片の長期の移入の間に、移植片の損傷を生じる原因として長い間考察されてきた (Abbott WM. 、Semin Vasc Surg 1997; 10-3-7; Pevec WC, Darling RC, L' Italien GJ, Abbott WM. 、J Vasc Surg 1992; 16: 60-65. ; Bergan JJ, Veith FJ, Bernhard VM, Yao JST, Flinn WR, Gupta SK, Scher LA, Samson EH, Towne JB. 、Surgery 1982; 92: 921-930; および Bos GW, Poot AA, Beugeling T, Van Aken WG, Feijen J, Arch Physiol Biochem 1998; 106: 100-115)。図3において示されるように、PEG/DNase I 処理されたブタ動脈欠陥のP-D関係は、処理されていないブタ動脈血管とほぼ同じ特性を示した。Triton-Xでの処理に比較すると、伸展特性において圧力依存性の様式で相違が存在する。剛性パラメータ ( $\beta$  値) は、各々の動脈について算出した。PEG/DNase I および Triton-Xでの各々の動脈処置の  $\beta$  値は、22.0 (PEG/DNase I) および17.5 (Triton-X) であった。天然の動脈の  $\beta$  値は、25.3 であった。これらのデータは、コラーゲンマトリクスの高次構造がPEG/DNase I で処理した移植片において維持されるようであることを示唆する。興味深いことに、基底膜成分であるIV型コラーゲンの残存が図2dにおいて示されるように観察される。ECの腔内への効率よい再細胞化は、この事実から推定される。これらの観察は、細胞外マトリクスがあまり損傷を受けずに残っていることを示唆する。再細胞化は、細胞親和性の改善により効率よく行われ得る。別の点において、この方法の各々の工程において毒性の界面活性剤のような毒性試薬を使用しないことは、本発明の特徴である。この事実から、処理後の脱細胞組織の弾力性は維持されるようである。

#### 【0150】

結論として、この方法により、抗原性および石灰化の原因であるようである細胞膜および細胞質成分が容易に除去され得る。従って、この方法によって、材料として有用な生体組織をより簡便かつより効率よく作製することが可能になる。

本発明の脱細胞化組織は、再生医療のための材料として有用であるだけでなく、細胞外マトリクスの基本研究にも有用な材料である。本発明者らの結果により、細胞外マトリクスがあまり損傷を受けずに残ることが示唆された。本発明の方法において生産された材料は、細胞外マトリクスの詳細な分析を可能にする。これらの生体組織は、細胞外マトリクスの三次元構造に影響を受けた細胞のバリエーションのインビボモデルとして天然の材料の利用に特に適切であり得る。

#### 【0151】

(実施例 2：生体組織内での反応の比較)

(方法)

(免疫学的応答)

Lewis ラットの背部皮下に脱細胞化処理ブタ大動脈弁 (PEG/DNase 1 処理弁および上述の第一世代 (SDS, NP-40) 処理弁の大動脈壁部分 (1 x 1 cm) を移植し、1 週間後屠殺して、炎症細胞浸潤の程度をスコア化し評価した。本実施例においてコントロールとしてブタ生弁および Free Style 弁 (グルタルアルデヒド固定・AOA 処理、従来使用されている生体弁) で比較検討した。

#### 【0152】

(石灰化)

ラット皮下に移植した検体を 2 ヶ月後に採取し、von Kossa 染色で石灰沈着を評価した。また、原子吸光分光計 (Atomic absorption spectrometry) で組織内 Ca 濃度を測定した。Ca 濃度は、濃塩酸 (または濃酸) に組織を入れて、加熱および溶解させる。その後、原子吸光測定を行う。その溶液を希釈し、高温プラズマ中に噴霧し、燃焼時に発生するスペクトルの元素特異的吸収波長 (Ca は 393.366 nm) より定量測定を行った。

#### 【0153】

SD ラット (250 g) の背部皮下に脱細胞化処理ブタ大動脈弁の大動脈壁部分 (10 x 10 mm) を移植し 2 ヶ月後に検体を採取し、Atomic absorption spectrometry (SPS7800: Seiko



Instrument Inc.) で組織内Ca濃度 (dry weightあたりのCa含量) を測定した (Ozaki S. Pathophysiology of calcification of bioprosthetic heart valves. Acta Biomedical Lovaniensia. 2001を参照のこと)。

#### 【0154】

(移植)

第一世代脱細胞化プロセスで得られた大動脈壁組織の一部をイヌ下行大動脈に移植した。

#### 【0155】

(結果)

脱細胞化組織およびコントロール組織を生後3週間のラットに移植して60日間観察した。摘出時に組織学的評価のために標本を取った。ヘマトキシーン-エオジン (H&E) 法で染色して全体構造を評価し、von Kossa染色により石灰化の評価を行った。結果を図7に示す。

#### 【0156】

その結果、ブタ生弁は複数層の炎症細胞浸潤を認めたが、脱細胞弁およびFree Style弁では移植片内への細胞浸潤はほとんどなく、軽い炎症反応のみであり、全体的な組織構造は損なわれていないことが分かった。

#### 【0157】

次に、石灰化を評価した図を図8に示す。図8からも明らかなように、von Kossa染色した標本の無機質化定性試験では、脱細胞弁は周囲組織接触面に石灰沈着を認めたが、内部は部分的な沈着のみであった。一方、グルタルアルデヒド固定・AOA処理した対照標本は全層性に著明な石灰沈着を認めた。

#### 【0158】

原子吸光分光計で測定した組織内Ca濃度は、脱細胞弁ではグルタルアルデヒド固定およびAOA処理した対照標本の約1/10であった。実際に組織内にカルシウム沈着 (石灰化) が少ないことが実証された。また、SDS処理に較べて、PEG処理ではさらに組織内Ca濃度が低いことが示された (図8下のグラフ

)。

#### 【0159】

さらに上述の第一世代 (SDS、NP-40 処理) 弁の大動脈壁組織の一部をイヌ下行大動脈に移植した実験では1匹が移植後2週間で移植片穿破により死亡した (図9aおよびb)。もう1匹は剖検が行われるまで生存した (データなし)。本発明のPEG/DNase I 処理弁での実験を施行したところ、すべて1ヶ月を超えて生存していた。この実験を同じように行い、移植後二週間で弁標本を摘出した。その結果を図10に示す。図10は、第一世代プロセスで脱細胞化したブタ大動脈弁の一部を大動脈壁に移植したイヌ胸部下行大動脈の外膜面を示す。移植後2週間で摘出された標本の剖検写真は、大動脈壁の大動脈瘤性拡張を示している。

#### 【0160】

(実施例3: 細胞置換の確認)

各弁の生体組織での反応の比較

イヌ大腿大動脈に脱細胞化処理ブタの前腕の動脈 (PEG/DNase I 処理血管およびSDS/NP-40 処理血管) を移植し、10日後そのブタを屠殺して、炎症細胞浸潤の程度を比較検討した。

#### 【0161】

(結果)

PEG/DNase I 処理血管とSDS/NP-40 処理血管のいずれにも軽い炎症反応のみであり、全体的な組織構造は損なわれていないことが分かった。図11にその結果をしめす。しかしながら、PEG/DNase I 処理血管では移植後10日目にもかかわらず血管内皮を認め、血管壁に筋細胞様の核を認めた。これは脱細胞化された血管が自己細胞に置換されたことを示す。

#### 【0162】

従来の脱細胞化組織では、宿主由来の細胞による置換は起こらなかったことから、本発明の脱細胞化組織は、従来技術にない極めて優れた効果を奏するといえる。

#### 【0163】

## (実施例 4：心膜の脱細胞化)

次に、ブタから心膜を取り出し、実施例 1 に記載のように界面活性剤およびポリエチレングリコール溶液で処理した。処理した心膜について細胞残存率および組織損傷率を測定したところ、組織損傷率が 30 % 未満でかつ細胞残存率が 10 % 未満の脱細胞化心膜が得られた。

## 【0164】

この心膜を、実施例 2 に記載のように、L e w i s ラットに移植し、炎症細胞の浸潤および石灰化について調べた。その結果、ポリエチレングリコール処理のものでは、ほとんど細胞浸潤も石灰化も見られなかったのに対して、界面活性剤処理のものでは、顕著な細胞浸潤および石灰化が見られた。また、ポリエチレングリコール処理のものを移植したラットは、界面活性剤処理のものを移植したラットよりも顕著に長く生存していた。

## 【0165】

## (実施例 5：硬膜の脱細胞化)

次に、ブタから硬膜を取り出し、実施例 1 に記載のように界面活性剤およびポリエチレングリコール溶液で処理した。処理した硬膜について細胞残存率および組織損傷率を測定したところ、組織損傷率が 30 % 未満でかつ細胞残存率が 10 % 未満の脱細胞化硬膜が得られた。

## 【0166】

この硬膜を、実施例 2 に記載のように、L e w i s ラットに移植し、炎症細胞の浸潤および石灰化について調べた。その結果、ポリエチレングリコール処理のものでは、ほとんど細胞浸潤も石灰化も見られなかったのに対して、界面活性剤処理のものでは、顕著な細胞浸潤および石灰化が見られた。また、ポリエチレングリコール処理のものを移植したラットは、界面活性剤処理のものを移植したラットよりも顕著に長く生存していた。

## 【0167】

このように、本発明の方法は、どのような組織を用いても同様の優れた特性を示す脱細胞化処理を行うことができることがわかる。

## 【0168】

以上のように、本発明の好ましい実施形態および実施例を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

### 【0169】

#### 【発明の効果】

本発明により、組織損傷率を臨床適用可能な程度に抑えつつ、免疫惹起反応も石灰化も起こさない程度に細胞残存率を下げる脱細胞化技術が確立された。この技術によって調製された脱細胞化組織およびグラフトを移植された生物は、実際に免疫惹起反応も石灰化も起こさずに生存する。また、本発明の技術によって調製された脱細胞化組織およびグラフトには、移植後に宿主由来の細胞が浸潤し置換することが認められた。このような事象はこれまで開発された組織グラフトでは決して起こらなかったことであり、このこと自体、本発明の予想外の極めて優れた効果を示すものといえる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、ヘマトキシリンおよびエオシンによる染色（H&E染色）による、脱細胞化組織の組織学的評価を示す。（A）および（B）は、処理なしのラット大動脈を示し、（C）は、PEG処理したラット大動脈を示す。（D）は、PEG/DNase I処理したラット大動脈を示す。（E）は、処理なしのブタ動脈を示す。（F）は、PEG処理したブタ動脈を示す。（G）は、PEG/DNase I処理したブタ動脈を示す。（H）は、Triton X処理したブタ動脈を示す。

##### 【図2】

図2は、（a）および（b）とも、脱細胞化を行う前のブタ大動脈弁組織および壁組織における細胞核の分布を示すH&E染色の顕微鏡写真（×10）である。弁尖および壁構造に相違が見られる。弁尖が薄くて密性結合組織でできていないことから、弁尖から細胞を除去するのはかなり容易であった。対照的に、壁組

織では、入り組んだ弾性層からなることから、組織の内外へ物質が拡散するのに障害が多い。図 2 a は、ブタ大動脈弁尖であり、図 2 b は、ブタ大動脈である。

### 【図 3】

図 3 は、(a) および (b) とともに、第一世代プロセスにより脱細胞化した後の弁尖および壁組織の顕微鏡写真 (×10) である。弁尖には細胞外マトリクス内にほとんど核が見られないが、大動脈壁には中央部 3 分の 1 で細胞および核の存在が確認できる。図 3 a は、第一世代プロセスで脱細胞化したブタ大動脈弁尖の H & E 染色を示す。右側が心室面相であり、左側が線維状層を示す。図 3 b は、第一世代プロセスで脱細胞化したブタ大動脈の H & E 染色を示す。大動脈壁の中央部に核が存在し、石灰面の右端には核が存在しないことが観察される。

### 【図 4】

図 4 は、(a) および (b) とともに、第一世代プロセスで脱細胞化を行った後の弁尖および大動脈壁の組織を観察した顕微鏡写真 (×10) である。弁尖には細胞は見られず、大動脈壁の側には好塩基性染色物質 (破壊されたクロマチンと考えられる) が散在するに過ぎない。図 4 a は、第一世代プロセスで脱細胞化したブタ大動脈弁尖の H & E 染色であり、図 4 b は、第一世代プロセスで脱細胞化したブタ大動脈の H & E 染色を示す。ブタ大動脈には、核残留物がごくわずかに観察されるのみである。

### 【図 5】

図 5 は、脱細胞化組織における I 型 ( (A) および (B) ) および I V 型コラーゲン ( (C) および (D) ) マトリクスの残留を示す。(A) および (C) ならびに (B) および (D) は、それぞれ、I 型および I V 型のコラーゲン染色の共焦点顕微鏡での蛍光および透過型の顕微鏡写真を示す。(E) および (F) は、脱細胞化組織における DiI 標識した EC の播種を示す。(A) および (C) は、処理なしのラット大動脈を示し、(B) および (D) は、PEG 処理したラット大動脈を示す。(E) は、血管内表面を示し、(F) は切片 (長軸) (上が内室) を示す。

### 【図 6】

図 6 は、処理したブタ大動脈および処理していないブタ動脈の P-D 関係を示

す。Aは、処理をしていないブタ動脈である。Bは、PEGおよびDNase I 処理したブタ動脈である。Cは、Triton（登録商標）X100で処理したブタ動脈である。A、BおよびCとも、x軸は、血管の直径（mm）を示し、y軸は、負荷圧力（mmHg）を表す。

#### 【図7】

脱細胞化組織（弁）をラット皮下に移植した後一週間の組織のH&E染色を示す図である。左には脱細胞化弁を示し、真ん中にはブタ生体の弁を示す。右側にはコントロールとして用いたFree Style弁を示す。図7の下には、細胞浸潤スコアを相対的に示した表を示す。脱細胞化組織（弁）およびFree Style弁は、0-1（すなわち、ほとんど浸潤が見られない）であり、他方ブタ生体弁では2（すなわち、複数の層における浸潤）であった。

#### 【図8】

図8は、カルシウム沈着の様子を示す顕微鏡写真（×40）である。カルシウム沈着はvon Kossa染色で行った。上部の左側に本発明の脱細胞化組織（弁）のカルシウム沈着の様子を示し、右側にコントロールとして用いたFree Style弁のカルシウム沈着の様子を示す。下部に、組織内カルシウム濃度を原子吸光分光計で測定した結果を示す。DCPVは本発明の脱細胞化組織を示し、Free Styleはコントロールとして用いたFree Style弁を示す。

#### 【図9】

図9は、イヌ移植実験後の大動脈壁移植片の様子を示す写真である。第一世代の脱細胞化プロセスで処理した大動脈壁組織の一部をイヌ下行大動脈に移植し、2週間後に死亡したイヌから移植片を取り出した。図9aは、ブタの大動脈壁移植片を移植されたイヌ胸部下行大動脈を管腔面から見た剖検写真であり、図9bは、同一の摘出標本を外膜面から見た剖検写真である。なお、本発明の脱細胞化プロセスにより処理された脱細胞化組織を移植されたイヌは1カ月を超えて生存していたことから、摘出していない。

#### 【図10】

図10は、2回目のイヌ移植実験後の剖検写真を示す。第一世代プロセスで脱

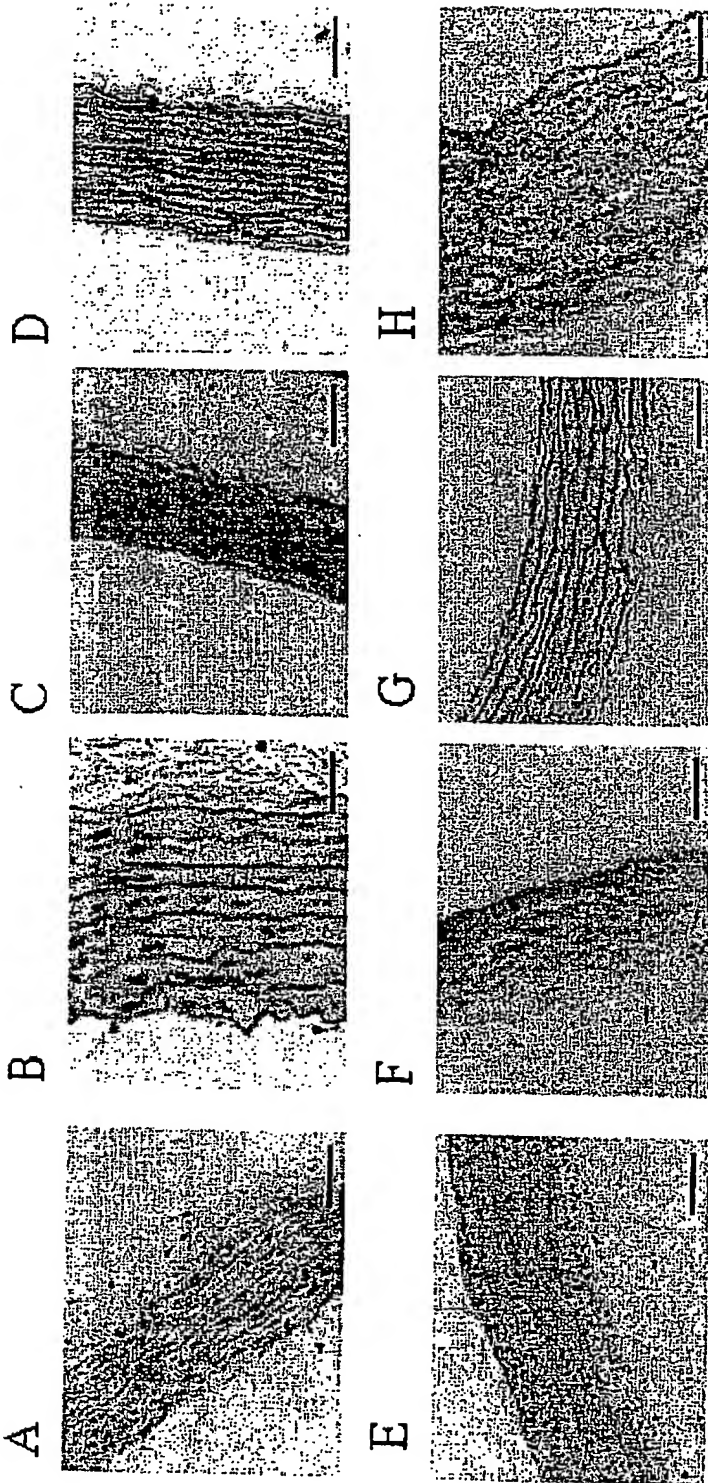
細胞化したブタ大動脈弁の一部を大動脈壁に移植したイヌ胸部下行大動脈の外膜面を示す。移植後2週間で死亡したイヌから摘出された標本の剖検写真は、大動脈の大動脈瘤性拡張を示す。

【図 11】

図11は、細胞置換を示す写真である。図11aは、従来型のSDS処理による脱細胞化組織における細胞置換を示す。ほとんど細胞置換されていないことがわかる。他方、図11bは、本発明のPEG処理による脱細胞化組織における細胞置換を示す。移植後10日目にしてすでにかかなりの細胞置換がなされていることがわかる。

【書類名】 図面

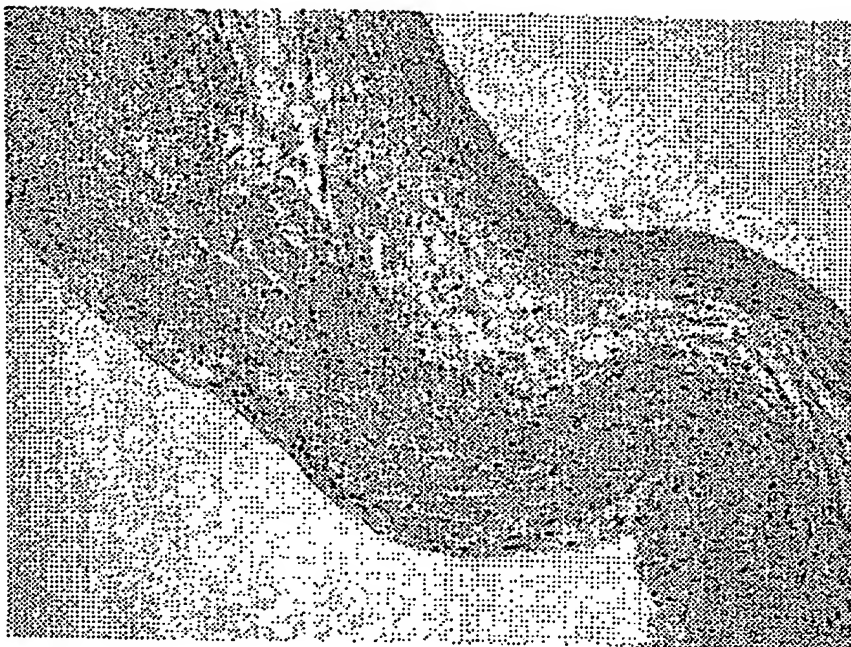
【図 1】



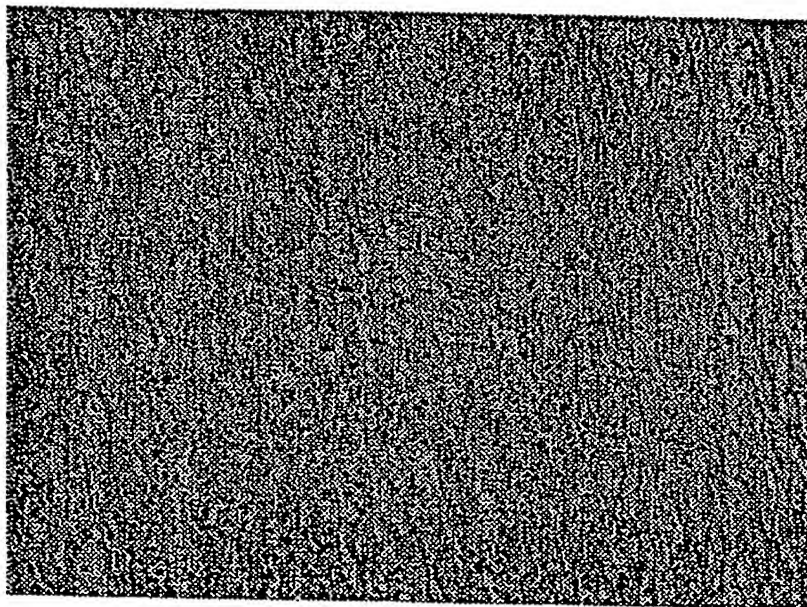


【図 2】

(a)

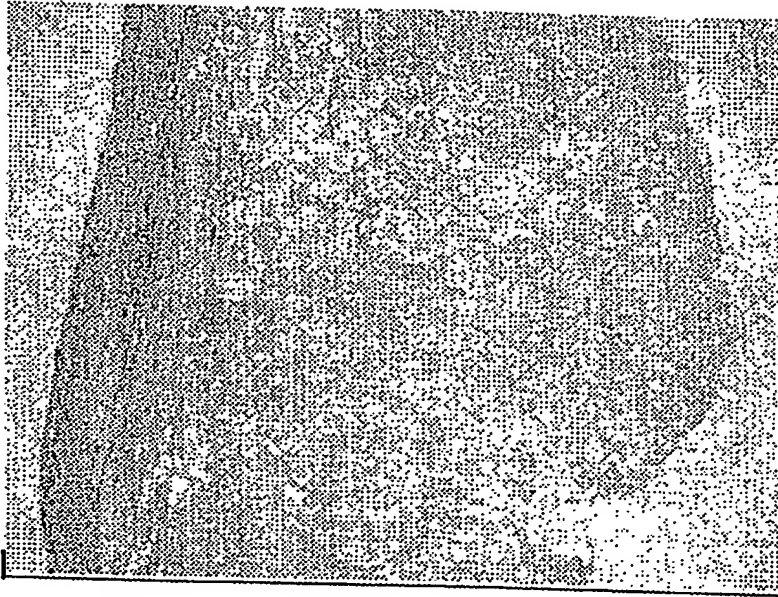


(b)

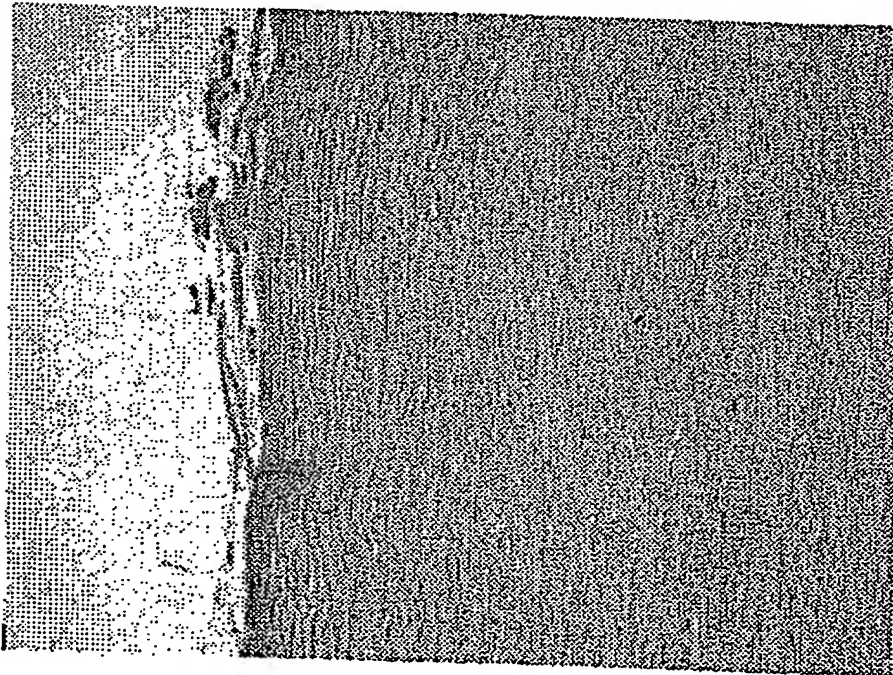


【図 3】

(a)

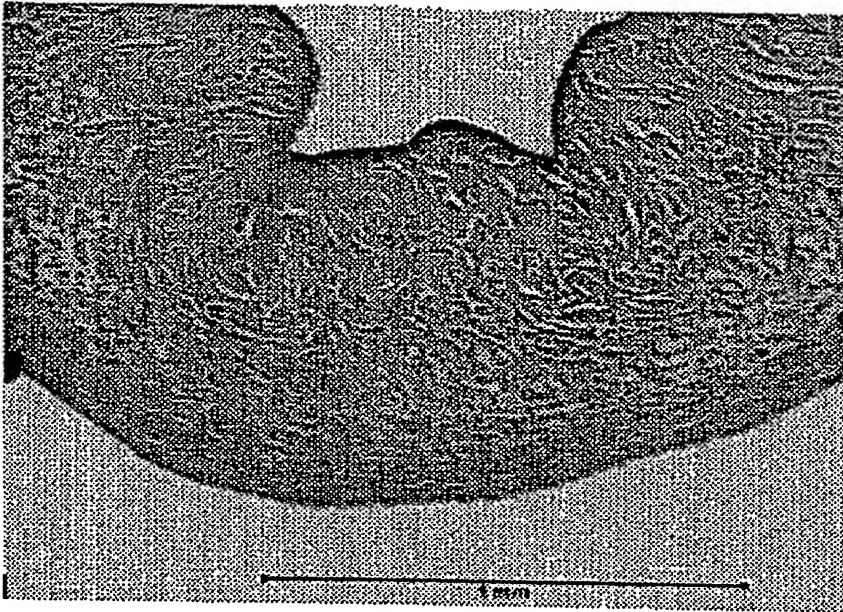


(b)

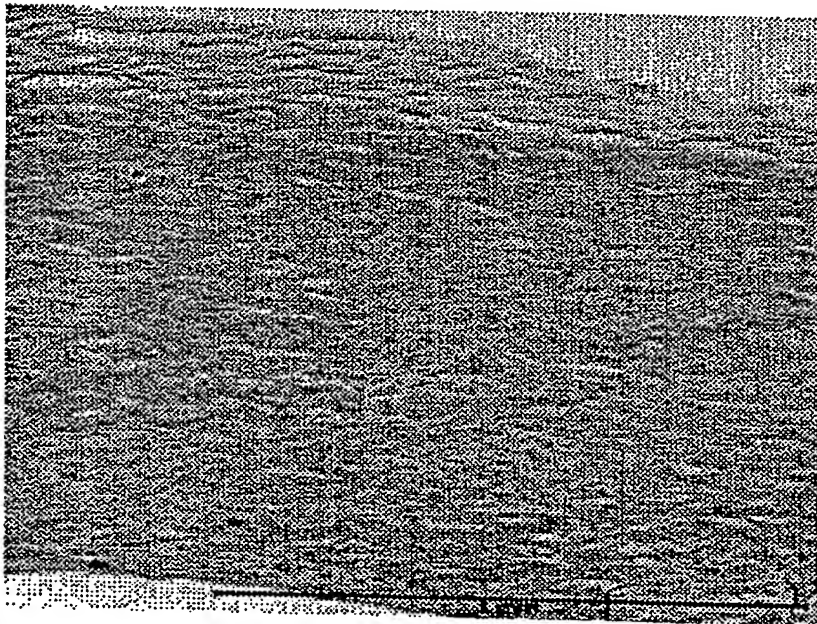


【図 4】

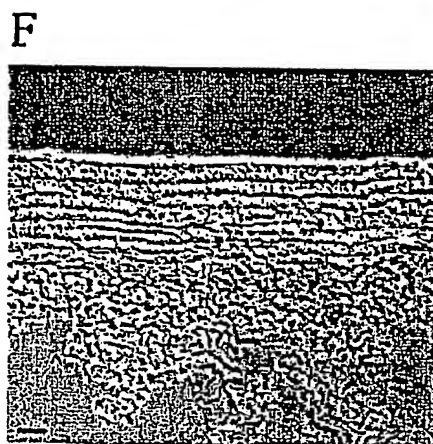
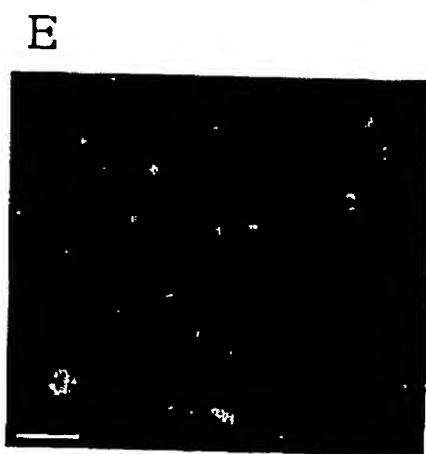
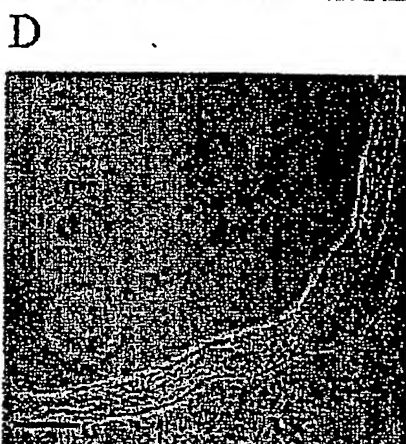
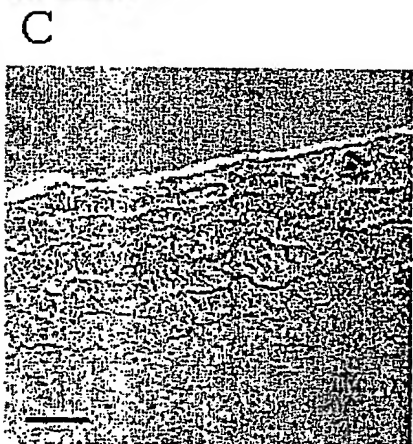
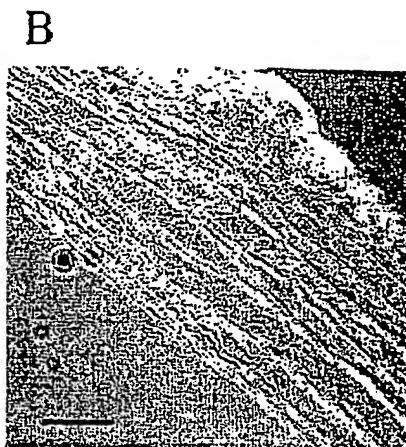
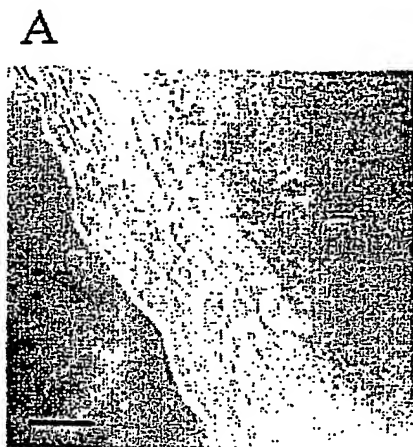
(a)



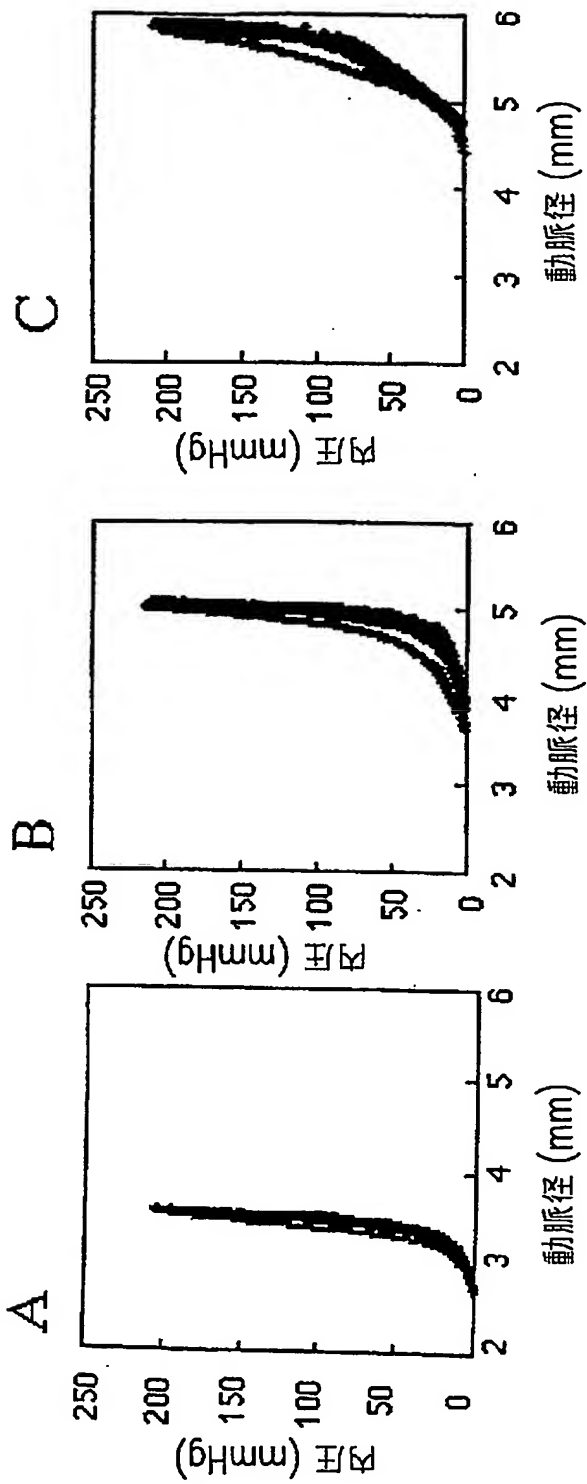
(b)



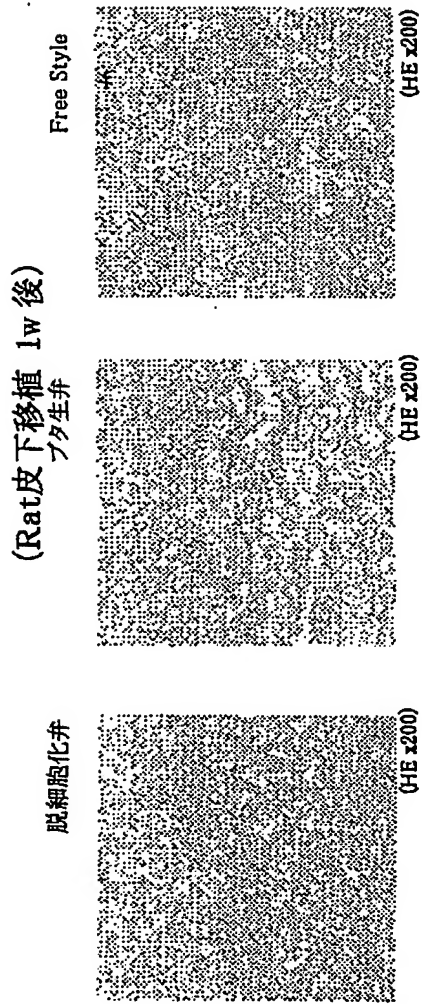
【図 5】



【図 6】



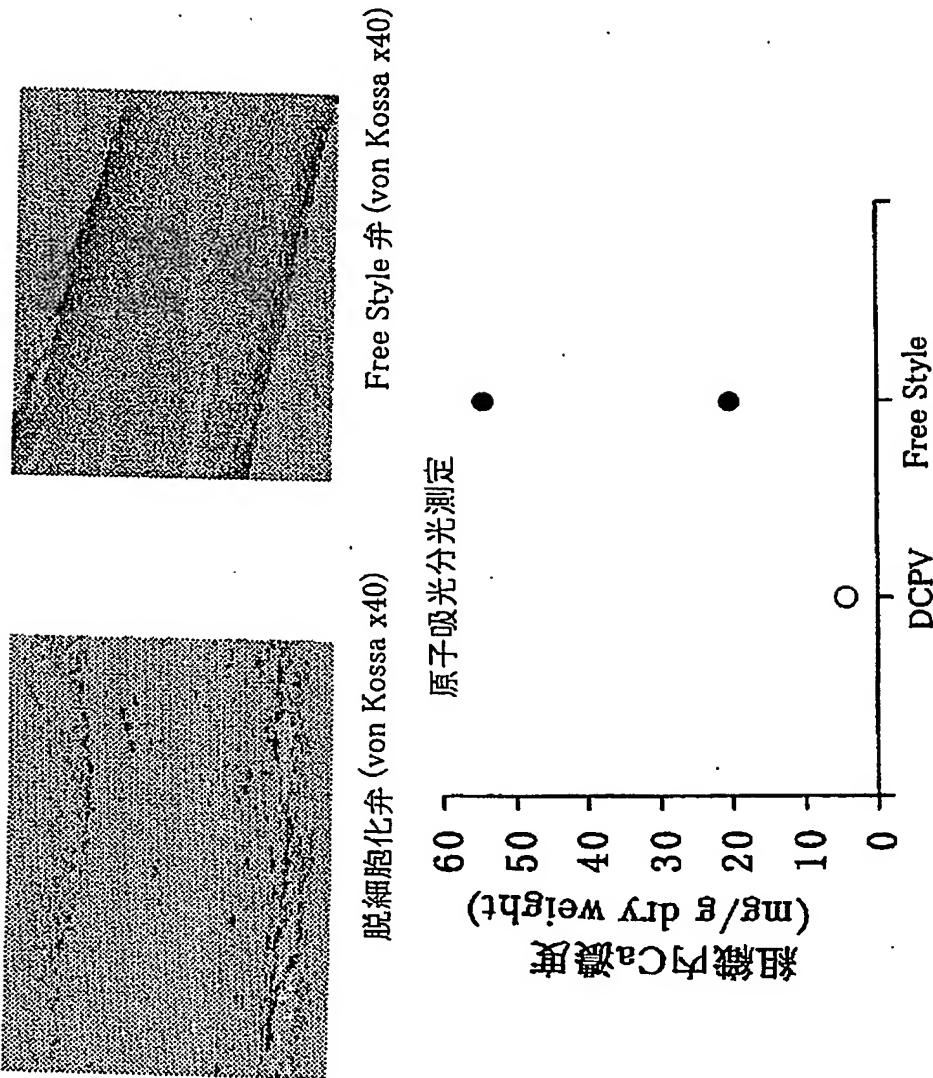
【図 7】



皮下移植	脱細胞弁	ブタ生弁	Free Style 弁
細胞浸潤スコア	0~1	2	0~1
(0: 浸潤なし, 1: 1-2 細胞層, 2: 多数層)			

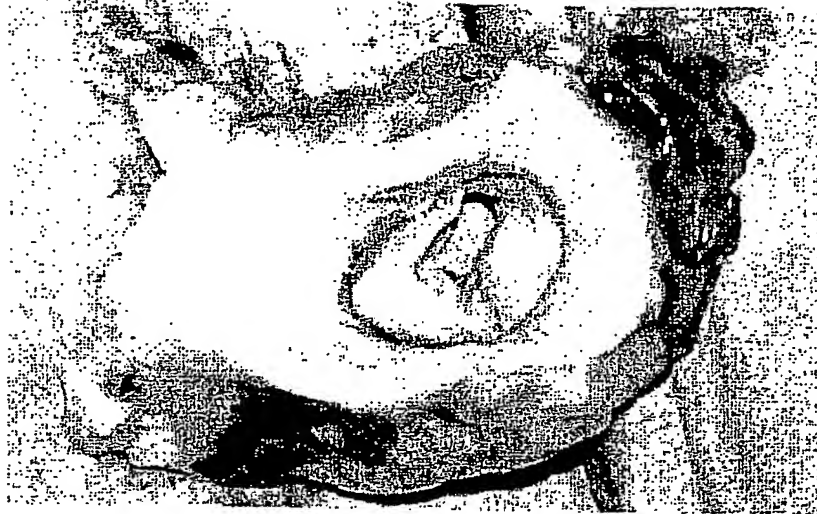


【図 8】



【図 9】

(a)

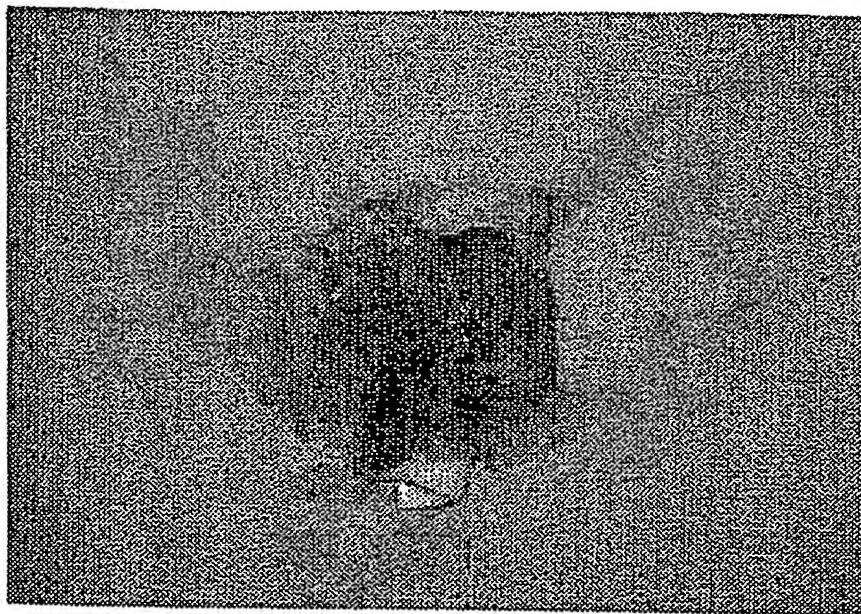


(b)



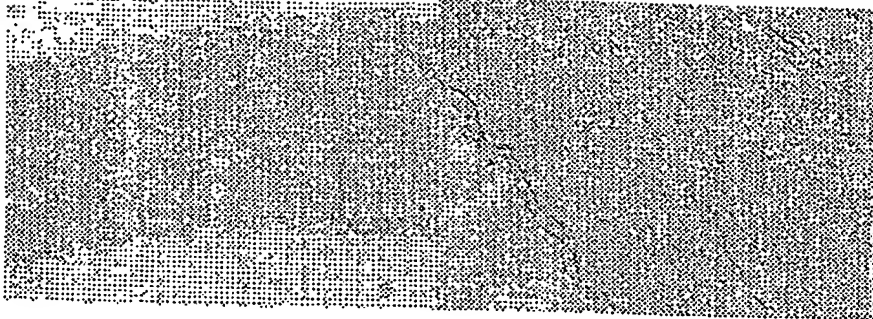


【図 10】

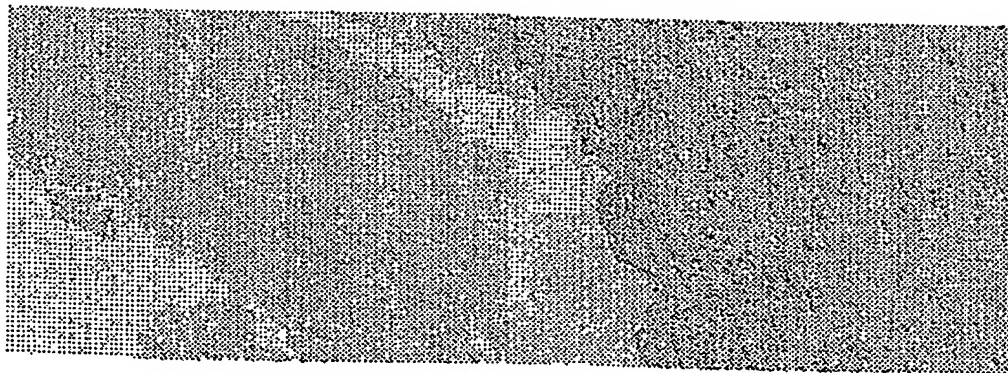


【図 11】

(a) SDS10 日目



(b) PEG 10 日目



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

臨床適用するための脱細胞化組織を調製するために、脱細胞化率が悪く、脱細胞化率を上げると、医療用途における使用に耐えないという問題点を克服すること。

【解決手段】

上記課題は、ミセル化しない両親媒性分子（例えば、1，2-エポキシドポリマー）を含有する溶液に組織を浸すことによって解決された。このことにより、石灰化も免疫惹起反応も起こさない程度の細胞残留率であり、かつ、臨床適用することができる程度に組織損傷率が抑えられた脱細胞化組織が提供された。上記処理により調製された組織は、好ましくは、組織強度も一定の値を保持する。また、本発明の組織は、細胞置換をも起こすという効果が達成された。

【選択図】 なし

特願 2002-191527

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502100138]

1. 変更年月日            2002年 3月20日  
   [変更理由]            新規登録  
     住 所                大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-41-9.11  
     氏 名                株式会社カルディオ
  
2. 変更年月日            2002年10月23日  
   [変更理由]            住所変更  
     住 所                大阪府大阪市北区天満4-15-5-302  
     氏 名                株式会社カルディオ

特願 2002-191527

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**